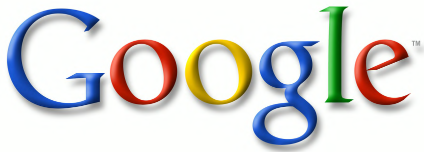
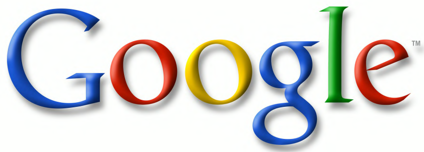




BAKTERIOLOGISCHES TASCHENBUCH

VON DR. RUDOLF ABEL

11. AUFLAGE



A. STUBER's VERLAG
(CURT KABITZSCH)
WÜRZBURG.


Ex-libris
Charles Atwood
Kofoid

Dr. H. Kikkert Cz



Bakteriologisches
TASCHENBUCH

enthaltend

die wichtigsten technischen Vorschriften

zur

bakteriologischen Laboratoriumsarbeit

von

Dr. Rudolf Abel,
Geheimem Medizinalrat in Berlin.

Elfte Auflage.

Würzburg.
A. Stuber's Verlag (Curt Kabitzsch).
1907.

1. Auflage 1889.
2. Auflage 1891.
3. Auflage 1894.
4. Auflage 1898.
5. Auflage 1900.
6. Auflage 1901.
7. Auflage 1903.
8. Auflage 1904.
9. Auflage 1905.
10. Auflage 1906.
11. Auflage 1907.

Kgl. Universitäts-Druckerei von H. Stürtz, Würzburg.

Vorwort zur elften Auflage.

Trotzdem nur neun Monate seit dem Erscheinen der zehnten Auflage verflossen sind, bringt die vorliegende neue Auflage des Taschenbuchs doch schon wieder eine grosse Zahl von Verbesserungen und Ergänzungen, die durch den Fortschritt der Forschung notwendig geworden sind. Sowohl in den allgemeinen Kapiteln wie in den Abschnitten über die einzelnen Mikroorganismen ist vieles geändert worden. Namentlich die über die Syphilisspirochäten, die Typhus- und Tuberkelbazillen, die Choleravibrionen, die Gonokokken, die Amoeben und die Malariaparasiten handelnden Teile sind ergänzt und erweitert. Neu hinzugekommen sind kleine Abschnitte über Trypanosomen, Rekurrensspirillen und über die bei der Hundswut zu findenden Negrischen Körperchen. Der Versuchung, auch kompliziertere Methoden aufzunehmen, die nicht in Unterrichtskursen gelehrt und gelernt und in der Praxis nicht überall ausgeführt werden können, wurde vorsichtig aus dem Wege gegangen; denn in erster Linie für den Lernenden bestimmt und in seiner Ausdehnung beschränkt vermag das Taschenbuch natürlich nicht alle neu aufkommenden, oft recht schwierigen Untersuchungsverfahren beizubringen. Neu eingefügte Methoden wurden dann durch Angabe des Ortes der Veröffentlichung belegt, wenn nach Lage der Dinge ein Zurückgreifen auf die Quelle für den Benutzer des Buches in Betracht kommen konnte.

Dem Anfänger wird empfohlen, vor Ausführung einer bestimmten Untersuchungsmethode jedesmal erst den ganzen dazugehörigen Abschnitt durchzulesen, damit nicht die Vernachlässigung allgemeiner Vorschriften und Regeln Fehlerfolge nach sich zieht.

Winke, wie auch mit einfachsten Mitteln im Laboratorium gearbeitet werden kann, bringt meine kleine Anleitung: Über einfache Hilfsmittel zur Ausführung bakteriologischer Untersuchungen in der ärztlichen Praxis, Würzburg, A. Stuber's Verlag 1907, 2. Auflage, deren bereits in der vorigen Auflage angekündigtes Erscheinen sich zu meinem Bedauern äusserer Umstände halber bisher verzögert hat.

Wertvolle Ratschläge für die Bearbeitung der elften Auflage sind mir von vielen Seiten zuteil geworden. Besonders zu Dank verpflichtet haben mich durch ihre liebenswürdige Beratung die Herren Dr. Daske, Prof. Dr. Ficker, Geh. Med.-Rat Professor Dr. Frosch, Dr. Lentz und Stabsarzt Dr. F. Scholz.

Möge auch die elfte Auflage sich als brauchbar erweisen und Freunde gewinnen!

Berlin, im Juni 1907.

Dr. Rudolf Abel.

Inhalt.

Literatur — Abkürzungen:

Ann. Past. — Annales de l'Institut Pasteur.
Arb. K. G. A. — Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte.
Arch. f. Hyg. — Archiv für Hygiene.
B. kl. W. — Berliner klinische Wochenschrift.
C. B. — Centralblatt für Bakteriologie (I = Abteilung I, Or. = Band Originale).
D. m. W. — Deutsche medizinische Wochenschrift.
Hyg. Rdsch. — Hygienische Rundschau.
Klin. Jahrb. — Klinisches Jahrbuch.
M. M. W. — Münchner medizinische Wochenschrift.
Veröff. d. K. G. A. — Veröffentlichungen des Kaiserl. Gesundheitsamtes.
Zschr. f. Hyg. — Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten.

I.

Das Mikroskop.

Bei bakteriologischen Arbeiten bedarf man der Trockenlinsen zur Orientierung in den mikroskopischen Präparaten und zur Betrachtung der Bakterienkolonien. Zur Untersuchung der Bakterien selbst bedient man sich der Immersionslinse.

Bei **Anwendung der Immersion** bringt man auf die saubere (Reinigung s. S. 5) Oberfläche des Deckgläschens (am gebräuchlichsten quadratische Form, 18 mm Seitenlänge, 0,16 mm Dicke) mit einem Glasstab ein Tröpfchen der Immersionsflüssigkeit (eingedicktes Zedernöl, nicht das zum Aufhellen von Gewebsschnitten dienende dünnflüssige). Dann senkt man den Tubus des Mikroskopes von der Seite beobachtend soweit, dass die Objektivlinse eben in die Immersionsflüssigkeit eintaucht. Nun blickt man durch das Mikroskop und senkt den Tubus durch Verschieben mit der Hand oder durch Drehung der grossen Triebschraube, wo eine solche vorhanden ist, vorsichtig weiter, bis ein verschwommenes Bild des Objektives sichtbar wird, worauf man die genaue Einstellung mit Hilfe der Mikrometerschraube besorgt.

Man untersucht Bakterien in a) ungefärbten und b) gefärbten Präparaten.

a) **Ungefärbte Präparate** dienen zum Studium lebender Mikroorganismen und werden in Form des **hängenden Tropfens** hergestellt.

Auf die Mitte eines, auf den Rand des Mikroskop-Objekttisches gelegten oder in eine Cornetsche Pinzette gefassten, sauberen (s. S. 5) Deckgläschens bringt man mit der ausgeglühten Platinöse ein Tröpfchen steriler physiologischer (0,7—8 prozentiger) Kochsalzlösung (auch Bouillon- oder Peptonwasser s. S. 9 u. 14), in das man darauf eine Spur (nicht zu viel!) des bakterienhaltigen Materials mit der Platinnadel überträgt; hat man eine nicht zu bakterienreiche Flüssigkeit zu untersuchen, so bringt man von dieser ein Tröpfchen ohne weitere Verdünnung auf das Deckgläschen. Alsdann kippt man das Deckgläschen so auf einen hohlen Objektträger, dessen Ausschliff man dick mit Vaseline umzogen hat, dass

das Tröpfchen frei in die Höhlung des Objektträgers hineinragt. Das Deckgläschen muss rings fest auf die Vaseline gedrückt werden, damit sich der Tropfen in einem völlig geschlossenen Raume befindet. Ist dies nicht der Fall, so entstehen Verdunstungsströmungen im Tropfen, die durch Mitreissen der Bakterien leicht Bewegung dieser vortäuschen können, und bei längerer Aufbewahrung trocknet der Tropfen ein. (Vor der gewöhnlichen Untersuchungsmethode mit Ausbreiten des Materiales zwischen Objektträger und Deckgläschen hat die Untersuchung im hängenden Tropfen den Vorteil, dass das Wassertröpfchen in seiner abgeschlossenen Kammer vor Verdunstung geschützt ist und nicht Hände und Instrumente zu beschmutzen oder zu infizieren vermag.)

Zur Untersuchung des Tropfens stellt man nun zunächst mit enger Blende und schwachem Objektiv seinen Rand so ein, dass er gerade durch die Mitte des Gesichtsfeldes zieht. Vertauscht man sodann das Objektiv mit der Immersionslinse, so muss, vorausgesetzt, dass die Objektivlinsen gleich zentriert sind, was gewöhnlich der Fall ist, der Tropfenrand wiederum gerade durch die Gesichtsfeldmitte gehen, also leicht auffindbar sein. Man bringt einen Tropfen Immersionszedernöl auf das Deckglas (ohne das Präparat zu verschieben) und nimmt weitere Blende. (Näheres s. S. 3 unter Beleuchtung.) Dann senkt man den Tubus, bis die Frontlinie in das Öl eintaucht, und führt ihn, nun durch das Mikroskop blickend, mit grösster Vorsicht, schliesslich nur mit der Mikrometerschraube, langsam nach unten, bis der Tropfenrand sichtbar wird. Es ist zweckmässig, während des Suchens mit einer Hand den Objektträger ganz leicht hin und her zu schieben; man merkt es dann sofort, wenn die zu tief gesenkte Linse auf das Deckgläschen drückt und es zu zersprengen droht; ausserdem wird der (bei der Einstellung zuerst schattenhaft erscheinende) Tropfenrand, wie jeder Gegenstand, leichter wahrgenommen, wenn er sich bewegt als wenn er still liegt. Nach aussen vom Tropfenrand sieht man ein feines Netzwerk — Wasserdampfniederschläge an der Unterseite des Deckglases um den Tropfen her. Geübtere suchen den Tropfen sofort mit Immersionslinse auf. Anfänger können ihm eine Spur ganz verdünnter Fuchsinlösung zusetzen, um ihn leichter im mikroskopischen Bilde aufzufinden; die geringe Menge Farblösung schädigt die Bakterien nicht. — Man sucht den Tropfenrand auf, weil sein Umriss dem Auge leichter auffindbar ist als das Tropfeninnere. Be-

wegliche Bakterien sammeln sich gern und bald am Tropfenrande wegen des dort regeren Gasaustausches zwischen Luft und Flüssigkeit an. — Zur Herstellung des Tröpfchens benutze man kein destilliertes Wasser, da dieses häufig die Beweglichkeit der Mikroorganismen beeinträchtigt. Soeben aus dem 37°-Brutschrank kommende Kulturen untersuche man in etwas angewärmter Flüssigkeit, damit die Bakterien nicht infolge von Kältestarre unbeweglich erscheinen. Vermeide Verwechslung von Brownscher Molekularbewegung (Hin- und Herzittern!) mit Beweglichkeit (Verlassen des Platzes, Gesichtsfeldes usw.)! Der Tropfen soll möglichst flach sein, damit er in allen Teilen der Besichtigung mit der Immersionslinse zugänglich ist. (Bei grösseren Tropfen liegen die tieferen Partien ausserhalb der Brennweite der Immersionslinse.)

Sterilisiert man das Deckgläschen in der Flamme und fertigt man das Tröpfchen aus einem flüssigen oder verflüssigten durchsichtigen Nährsubstrate, so hat man einen Kulturapparat, in dem man die Entwickelung der Bakterien, nötigenfalls unter Zuhilfenahme eines heizbaren Objekttisches oder Mikroskopes, mit dem Auge verfolgen kann.

Nach erfolgter Untersuchung werden die Deckgläschen so vom Objektträger abgehoben, dass der Tropfen nicht den Objektträger berührt, und in rohe Schwefelsäure zur Abtötung der Bakterien geworfen. Der Objektträger kann sogleich für ein neues Präparat gebraucht werden, oder er wird mit Fliesspapier von der Vaseline befreit und mit benzinbefeuchtetem Tuch nachgeputzt.

b) Über die **Herstellung gefärbter Ausstrich- und Schnittpräparate** s. S. 33 ff.

Beleuchtung des mikroskopischen Bildes.

Bei der Untersuchung von hängenden Tropfen gebrauche man den Hohlspiegel und enge Blende (oder enge Stellung der Irisblende) zur Hervorrufung eines Kontur- oder Brechungsbildes. Je stärker das Objektiv, desto weiter öffne man die Blende, — etwa zur Hälfte bei der Immersion. Den Abbeschen Beleuchtungsapparat schaltet man durch die Anwendung der Blende aus, so dass man nicht nötig hat ihn zu entfernen.

Bei der Untersuchung gefärbter Präparate wende man den Planspiegel ohne Blenden an zur Hervorrufung eines Absorptions- oder Farbenbildes. Dabei tritt der **Abbesche Beleuchtungsapparat** in Tätigkeit. Dieser soll so ein-

gestellt sein, dass das von ihm entworfene Bild der Lichtquelle genau auf die Stelle fällt, an der das zu untersuchende Präparat liegt. Man stellt zunächst bei beliebiger Spiegelstellung durch Heben und Senken des Tubus das zu untersuchende Präparat mit schwacher Objektivlinse scharf ein. Dann richtet man den Planspiegel auf einen entfernten Gegenstand (z. B. einen Baum, ein Haus) und hebt und senkt den Beleuchtungsapparat ohne weitere Bewegung des Tubus so lange, bis man im und mit dem Bilde des Präparates gleichzeitig ein scharfes Bild von dem sich spiegelnden Gegenstande wahrnimmt In dieser Stellung lässt man den Beleuchtungsapparat, richtet aber den Spiegel nunmehr statt auf den Baum oder das Haus auf eine andere gleichsam in unendlicher Entfernung liegende Lichtquelle, die kein störendes Eigenbild liefert, z. B. eine weisse Wolke. (Die genaue Einstellung des Abbeschen Apparates in der beschriebenen Weise ist nicht jedesmal erforderlich; es genügt in der Regel, den Apparat bei ferner Lichtquelle so hoch als möglich empor zu schieben oder zu schrauben, bei naher etwas tiefer zu stellen, um gute Wirkung von ihm zu haben, bei schlechter Belichtung stelle man ihn aber genau ein.) Blendend weisses Wolkenlicht dämpft man durch Einlegen einer leicht blauen Glasscheibe in den Abblendungsapparat des Mikroskopes oder durch Fenstervorhänge u. dergl.

Als künstliche Lichtquelle eignet sich elektrisches Licht (mattgeschliffene Birne) oder Gasglühlicht. Auch Petroleumlicht ist gut brauchbar, wenn man eine blaue Glasscheibe in den Blendenhalter des Mikroskopes einlegt oder aber das Licht durch eine Schusterkugel (oder einen Kolben) mit Kupfersulfat-Ammoniak gehen lässt (Füge zu kräftig blauer Kupfersulfatlösung soviel NH_3, bis das durch die Mischung fallende Licht der Petroleumlampe im Mikroskop rein weiss erscheint. Verschliesse Öffnung der Kugel mit Stopfen) — Bei naher Lichtquelle nehme man, wenn deren Bild die Untersuchung des Präparates stört, auch für gefärbte Präparate den Hohlspiegel; oder man hebe nach genauer Einstellung des Bildes der Lichtquelle den Abbeschen Apparat ein wenig.

Die sogen. Dunkelfeldbeleuchtung (besondere Mikroskopeinrichtung — Ultramikroskop) lässt feinste Körper auf dunklem Grunde hell aufleuchten; wird z. B. zur Beobachtung lebender Syphilisspirochäten gebraucht.

Reinigung des Mikroskops: Will man ein Immersions-Präparat unter dem Mikroskope entfernen, so hebe man

stets zuerst den Tubus, damit die Frontlinse nicht beim Fortziehen des Objektträgers geschrammt werden kann.

Nach dem Mikroskopieren entferne man die Immersionsflüssigkeit von der Linse mittelst feinen Fliesspapiers (Josephpapiers), putze dann die Linse mit sauberem Lederlappen. Ist die Linse mit verharztem Öl, Kanadabalsam oder dergl beschmutzt, so kann man sie (wie die anderen Linsen auch) mittelst eines Lederläppchens oder feinsten Fliesspapiers mit Xylol, Benzin oder dergl. putzen. Vorsicht, da diese Stoffe bei längerer Berührung die Fassung der Linsen lösen können!

Das Mikroskop schützt man nach Gebrauch vor Licht und Staub (geschwärzte Glasglocke oder Pappkasten darüber stülpen oder es in den Mikroskopkasten bringen). Schraubt man dabei die Objektivlinsen nicht ab, so bringt man etwas feines sauberes Fliesspapier zwischen Abbeschen Apparat und die über ihm stehende Objektivlinse zur Verhütung unmittelbarer Berührung zwischen beiden!

Konservieren von Präparaten s. S. 35, 39 und 113.

Reinigung der Deckgläschen: 1. Neue Deckgläschen werden mit Alkohol und Äther $\overline{aa}$ oder mit Xylol oder Benzin und feiner Leinwand und dünnem Fliesspapier geputzt. Auf sie gebrachte Wassertröpfchen müssen sich gleichmässig verreiben lassen; gelingt dies nicht, Wiederholung des Putzens oder Behandlung wie gebrauchte. Auch Erhitzen der nebeneinander liegenden Deckgläschen auf einem Blechstreifen über der Flamme oder vorsichtiges Abbrennen in der Flamme erleichtert oft die Reinigung, genügt manchmal allein.

2. Gebrauchte Deckgläschen. a) Die Gläschen werden nach beendeter Untersuchung in ein Wasserglas mit roher Schwefelsäure geworfen, zum Putzen mit der Säure in eine weite Porzellanschale geschüttet, nach Abgiessen der Säure mit wiederholt erneuertem Wasser gewaschen, mit starker Kalilauge oder Pottasche gekocht, wieder mit Wasser gespült und weiter geputzt wie neue mit Alkohol usw. b) nach Zettnow: 1. Kochen der Deckgläschen 10 Minuten unter Umrühren in folgender Lösung: 200 g doppelt chromsaures Kali gelöst in 2 Liter Aqua fervida + 200 ccm rohe Schwefelsäure. 2. Abgiessen der Flüssigkeit, Nachspülen 5 Minuten in verdünnter Natronlauge. Wiederholung beider Proceduren (1. nur 5 Minuten). Spülen mit Wasser, Alkohol, Putzen.

II.

Sterilisation und Desinfektion.

Alle Geräte und Nährböden, die man bei der Kultivierung von Mikroorganismen gebrauchen will, müssen frei von Keimen sein, weil diese sich sonst ebenfalls entwickeln, Verunreinigungen und Täuschungen bewirken können.

Man halte sich an folgende allgemeinen Regeln:

1. Kleinere Gegenstände wie Platinnadeln, Messer, Scheren, Pinzetten, Glasstäbe kann man *in der Flamme* sterilisieren. Platingegenstände erhitzt man dabei bis zur Rotglut, die anderen Gegenstände nicht bis zum Glühen, sonden nur bis alle zur Berührung mit dem bakterienhaltigen Materiale bestimmten Stellen wenigstens ein paar Sekunden von der Flamme beleckt worden sind. Metallinstrumente werden durch Abbrennen stumpf und laufen an, bessere sind daher nach 2. oder 3. zu sterilisieren. Nur Platiniridiuminstrumente (teuer!) bleiben trotz häufigen Ausglühens schneidend (gut für Abimpfung von harten und zähen Kulturbelägen — Aktinomyces, Pilze —, auch zur Blutentnahme — s. S. 100.) Auch Glasplatten, Reagenzgläser (bis der etwa hineingeschobene Wattebausch beginnt, sich zu bräunen!), kleinere Glasschalen, Pipetten, Spritzenteile (wenn sie keine durch Feuer angreifbaren Bestandteile enthalten) kann man im Notfalle in der Flamme sterilisieren.

2. Alle grösseren Gegenstände, die *trockene Hitze* vertragen können — Glassachen, Metallgegenstände (gelötete nicht), Watte, Fliesspapier werden im Lufttrockenschranke $^1/_2$ St. bei 150—200° sterilisiert. Watte erhitzt man nicht über 180°, da sie sonst braun wird und zerfasert; desgl. Fliesspapier, das sich bräunt.

3. Dinge, die trockene Hitze nicht, aber das Kochen ohne Veränderungen zu erleiden vertragen, werden durch *Erhitzen im Dampf* sterilisiert. Hierzu gehören Gummisachen, Flüssigkeiten und Nährsubstrate ausser den koagulierbares Eiweiss enthaltenden. Für die meisten Fälle genügt Aufenthalt im strömenden Dampf von 100° $^1/_4$ bis $^1/_2$ St. lang. Grössere Flüssigkeitsmengen müssen länger als kleinere

behandelt werden (bis 1 Std.), weil sie sich langsamer auf 100° erwärmen. Also Literkolben voll Flüssigkeit länger kochen als Reagenzgläser! Enthalten Nährmaterialien widerstandsfähige Sporen, so bringt man sie entweder an drei aufeinanderfolgenden Tagen je 1/4—1 Stunde in den Dampfstrom und hält sie inzwischen bei ca. 20 oder auch bei 37° (man erwartet, dass hier die Sporen auskeimen und dass die entstandenen vegetativen Formen durch die nächste Kochung abgetötet werden); oder man sterilisiert sie im Autoklaven bei Temperaturen bis 130° und entsprechendem Atmosphärendrucke (hat den Vorteil, dass man nicht mehrere Tage bis zur erreichten Sterilisation warten muss, ist aber z. B. für Gelatine wegen Beeinträchtigung der Erstarrungsfähigkeit, für Milch und andere zuckerhaltige Nährböden wegen Eintretens brauner Färbung nur mit Vorsicht [s. die einzelnen Nährböden] verwendbar.) Eine Temperatur von 120° tötet in 10—15 Minuten, eine von 130° in 1 Minute alle Keime.

Instrumente zu chirurgischen Eingriffen sterilisiert man durch 15 Minuten langes Kochen in 1—5 %iger Sodalösung (zweckmässig Apparate nach Schimmelbusch).

4. Gegenstände, die weder trockene Hitze noch Kochen vertragen ohne Veränderungen zu erfahren (Serum, Eiereiweiss etc.) können

a) steril aufgefangen werden (vgl. Blutserum S. 15) oder

b) einer fraktionierten Sterilisation bei 56—60° täglich 1—4 Std. lang mehrere (bis 8) Tage hintereinander unterworfen und inzwischen bei ca. 20 oder 37° (Begründung vgl. oben unter 3!) gehalten werden. Die Methode wirkt aber nicht sicher, da für manche Organismen die Temperatur um 60° gerade erst das Entwickelungsoptimum darstellt, ferner nicht alle Sporen zwischen zwei Erhitzungen auszukeimen brauchen oder aber sich dabei schon neue bilden oder

c) durch Chamberland-, Berkefeld-, Pukall-, Isny-Filter oder ein selbstgefertigtes Asbestfilter nach Heim (Ctrbl. f. Bakt. Ref. Bd. 38, Beiheft S. 52) unter Zuhilfenahme einer Wasserstrahlluftpumpe keimfrei filtriert werden. Eiweisshaltige Flüssigkeiten filtrieren aber schwer (eher noch bei leichter Anwärmung). Durch solche Filtration kann man gelöste Bakterienstoffwechselprodukte von den Bakterienleibern trennen.

Wegen Sterilisation von Serum usw. vgl. ferner S. 14 ff.

5. Abwaschen oder Ausspülen mit 5 ‰iger Sublimatlösung, dann mit Alkohol und Äther $\overline{aa}$ ist für manche Objekte zur Sterilisation brauchbar (z. B. für Gummisachen), wirkt aber nicht ganz sicher. Wo es angeht, brenne man die letzten Reste Alkohol-Äther in der Flamme ab.

6. Handelt es sich nur darum, Bakterien zu töten, z. B. gebrauchte Reagenzröhrchen zu desinfizieren, so bedient man sich am besten einer Sublimatlösung 1 : 1000 mit Zusatz von 1 % HCl oder NaCl. Gebrauchte Kulturgefässe kann man auch durch 1—2 stünd. Kochen in einem Topf mit Wasser oder im Dampfstrom von lebenden pathogenen Keimen befreien. Mit Bakterien **infizierte Hände** reinige man durch gründliches Abspülen in Sublimatlösung 1 : 1000 oder Kresolseifenlösung 1 : 100. Dann Waschen mit Wasser, Seife, Bürste, darauf in frische Desinfektionslösung und nochmals waschen. NB : Das erste Waschwasser nebst Bürste kann unter Umständen noch lebende Keime enthalten, ist daher eventuell zu desinfizieren! — Unschädlichmachung von Tierkadavern s. S. 113.

III.

Die Nährsubstrate. Allgemeines.

Die Grundlage für die gebräuchlichsten Bakteriennährböden ist das

Fleischwasser.

1. 500 g feingehacktes möglichst fettfreies Rind- oder Pferdefleisch werden mit 1 Liter gewöhnlichen Wassers ½ Std. bei ca. 50 ° im Kochtopf ausgezogen, dann ½—¾ Std. gekocht (Vgl. auch S. 11 unten Ziffer 1!)

2. Die Brühe wird vom Fleisch abfiltriert oder koliert und zu einem Liter mit Wasser aufgefüllt. Eingiessen in einen Kolben mit Wattebauschverschluss.

Aus diesem Fleischwasser werden hergestellt Nährbouillon, Nährgelatine und Nähragar. Soll es aufbewahrt werden, muss es an drei aufeinander folgenden Tagen je ½ Std. im Dampfstrom oder einmal 15 Min. bei 120 ° im Autoklaven gekocht werden.

Nährbouillon.

1. Zu dem Fleischwasser werden zugesetzt 1 % Pepton (am besten Witte-Rostock oder Chapoteaut-Paris oder nach Martin [Ann. Past. Bd. 12 S. 26] selbst hergestelltes) oder auch mehr, bis zu 5 %, und 1/2 % Kochsalz. Für die Züchtung mancher Bakterien ist auch ein Zusatz von 0,1—1 % Traubenzucker nützlich. (Zucker erst gegen Schluss der Herstellung zufügen, weil bei längerem Kochen Karamelisierung und damit Braunfärbung des Nährbodens eintritt, — s. auch S. 7 Abs 1. Zweckmässig setzt man erst zur fertigen Bouillon die nötige Menge 10 %iger sterilisierter Zuckerlösung hinzu.)

2. Kochen im Dampfstrom bis zur Lösung der Zusätze.

3. Neutralisieren mit gesättigter wässeriger (auch 10 %iger oder Normal-) Lösung von Natrium carbon. (auch biphosphor.) oder 25 %iger NaOH. Die Grenze ist erreicht, wenn empfindliches blaues Lackmuspapier beim Tüpfeln nicht mehr gerötet wird (Benetzung des Papiers mit einem Tropfen Leitungswasser zum Vergleich der Färbung!); rotes wird dann schon gebläut. Hat man zuviel Alkali zugesetzt, fügt man tropfenweise Phosphorsäure (auch Milch- oder Salzsäure) zu. Ein geringer Überschuss von Alkali (Na_2CO_3, nicht NaOH) schadet fast nie (vergl. Nährgelatine S 10 Abs. 4).

Neutralisieren mit Phenolphthalein-Indikator s. S. 12 sub 3.

4. Kochen im Dampfstrom 1/4—1/2 Stunde.

5. Filtrieren. — Nochmalige Prüfung der Reaktion des Filtrates, eventuell korrigieren, wiederum kochen und filtrieren. — Falls das erkaltete Filtrat nicht klar ist, nochmals filtrieren oder Klärung wie bei Nährgelatine, — s. unten.

6. Sterilisieren im Kolben oder nach Abfüllung in Röhrchen an zwei oder drei aufeinander folgenden Tagen je 1/4 bis 1/2 Stunde im Dampfstrom oder nach S. 6 Ziffer 3 im Autoklaven.

Nährgelatine.

1. Zu dem Fleischwasser dieselben Zusätze wie bei Bereitung der Nährbouillon, ausserdem aber noch 10 %, im Sommer 15 % feinste weisse Speisegelatine.

2.—6. Wie bei Nährbouillon (s. oben) Bekommt man trotz richtiger Reaktion und dichten Filters nicht ein völlig klares Filtrat, so setzt man zu der auf etwa 50° abgekühlten Gelatine das Weisse von einem Hühnerei oder 10—20 ccm aus

rohem Fleisch kalt ausgepressten Fleischsaftes, schüttelt kräftig und filtriert nach tüchtigem Aufkochen noch einmal.

Die Gelatine bleibt bis zu 20—27° (s. weiter unten) fest, schmilzt bei etwas höheren Temperaturen langsam, bei 35° schnell, erstarrt geschmolzen bei Temperaturen unter 20° bald wieder. Man koche Gelatine nicht zu häufig und zu lange, besonders vorsichtig im Autoklaven bei mehr als 100° (einmaliges Erhitzen auf 110° für 15 Min. verträgt sie), da sonst ihr Erstarrungsvermögen leidet. Der Schmelzpunkt liegt um so höher, je weniger oft und lange die Gelatine gekocht wird. Bei eben fertig gestellter Gelatine ist er stets etwas niedriger, als bei der 24 Stunden und mehr erstarrt aufbewahrten.

Nährgelatine mit besonders hohem Schmelzpunkt nach Forster: In 1 l 60° warmer, steriler Nährbouillon solve (in kleinem Kessel) 100—150 g Gelatine. (Im Handel gibt es besonders „harte“ Gelatine.) Adde KOH bis zu schwach saurer Reaktion, alkalisiere leicht mit Na_2CO_3. Danach adde das Weisse eines Eies. Stelle Kessel in grossen Kochtopf mit kochendem Wasser, rühre Gelatine gut um; sie ist in etwa 3 Min. auf 98—99° erhitzt. Nun koche den grossen Kochtopf samt Gelatinekessel mit aufgelegtem Deckel etwa 15 Min. Filtriere in 60° warmem Warmwassertrichter, der nebst Filter, Sammelkolben und Abzapfvorrichtung vorher sterilisiert ist. Sammle die ganze Gelatine in einem Kolben. Fülle sie steril ab in sterile Röhrchen und erhitze 20 Min. lang im strömenden Dampf. Kühle schnell ab durch Einsetzen in kaltes Wasser. Die Gelatine ist dann gebrauchsfertig und steril; ihr Schmelzpunkt liegt nach mehrtägiger Aufbewahrung bei 29—30°, vorher etwas niedriger. (Das Wesentliche der Methode liegt in der kurzen Kochdauer der Gelatine; s. oben!)

Leicht alkalisierte Gelatine empfiehlt sich für manche Bakterien. Ein Zusatz von 10—15 ccm Normalsodalösung pro Liter Gelatine über die neutrale Reaktion hinaus schadet kaum jemals. Bestimmte Bakterien verlangen noch höhere Alkalescenz (vgl. später). — Es entsprechen: 10 ccm Normalsodalösung 5,3 ccm 10 %iger Lösung wasserfreier Soda oder 14,3 ccm 10 %iger Lösung kristallisierter Soda. Eine 10 %ige Lösung kristallisierter Soda enthält 3,7 % Na_2CO_3, Normalsodalösung 5,3 % Na_2CO_3.

Nähragar.

1. Zu dem Fleischwasser dieselben Zusätze wie bei Bereitung der Nährbouillon, ausserdem $1\frac{1}{2}$—2 % fein zerschnittenes oder pulverförmiges Agar-Agar. Es ist gut, das schwer lösliche Agar schon ein paar Stunden vor den anderen Zusätzen zuzufügen und aufweichen zu lassen, weil es sich dann schneller löst.

2. 3. 4. Wie bei Nährbouillon. (S. 9.)

Reaktion prüfen, eventuell korrigieren.

5. Der flockig trübe Nährboden müsste nun filtriert werden. Dies gelingt durch Filtrierpapier selbst unter Zuhilfenahme eines heizbaren Trichters oder im Dampfstrom nicht leicht. Daher filtriert man besser durch Watte: In einen Trichter bringt man eine vierfache Lage Verbandwatte, die über den Rand herausragen muss, kocht den so vorbereiteten Trichter 1 Stunde im Dampftopf und gibt sogleich das noch heisse Nähragar hinein. Oder man verzichtet auf Filtration ganz, lässt das flüssige Agar im Dampfsterilisator nach Löschen der Flamme einige Zeit stehen, wobei sich die Trübungen grösstenteils absetzen, giesst oder hebert die oberen ziemlich klaren Agarpartien ab und klärt sie wenn nötig nochmals durch Absitzenlassen (enge hohe Glaszylinder oder Spitzgläser sind hierzu sehr gut brauchbar; man kann das Agar auch darin erstarren lassen, es dann herausklopfen und die trüben Partien durch Abschneiden entfernen).

6. Wie bei Nährbouillon. (S. 9)

Wiederholtes Kochen schädigt das Erstarrungsvermögen des Nähragars nicht. Agar wird erst bei 90—100° flüssig, bleibt es dann bis auf einige 40° herab; bei noch niedrigerer Temperatur erstarrt es sehr schnell, fast plötzlich. Erstarrendes Agar scheidet etwas Flüssigkeit (sog. Kondenswasser) aus.

Modifikationen der Nähr-Bouillon-, Gelatine- und Agar-Bereitung.

1. Das Fleischwasser kann auch noch in etwa 4facher Verdünnung zur Bereitung der Substrate verwendet werden, ohne dass deren Nährkraft beeinträchtigt wird. — Fleischwasser kann man auch aus Fleisch anderer Tiere als Rind und Pferd, ferner aus Placenten, Bullenhoden (sehr billig!) u. dergl. bereiten.

2. Statt des Fleischwassers lässt sich auch eine 1—2 %ige Lösung Liebigschen Fleischextraktes ver-

wenden. (Ein Kochsalzzusatz zu den Nährböden ist dabei unnötig.) Doch sind die damit hergestellten Substrate den Fleischwassernährböden nicht ganz gleichwertig. Für **Wasseruntersuchungen** wird amtlich folgende Gelatine empfohlen: Solve Fleischextrakt Liebig 2, Pepton Witte 2, NaCl 1 in Aqua 200. Koche 1/2 Stunde im Dampf, nach Erkalten und Absetzen filtra. Adde auf 900 Teile dieser Lösung 100 Teile Gelatine, koche nach Quellen und Erweichen der Gel. bis höchstens 1/2 Std. im Dampf. Der heissen Lösung adde von 4%iger NaOH 30 Teile, dann von der gleichen NaOH tropfenweise, bis blaues Lackmuspapier nicht mehr gerötet wird. Erhitze 1/4 Std. im Dampf, prüfe Reaktion und korrigiere sie, wenn nötig. Adde 1 1/2 Teile kristallisierte, nicht verwitterte Soda, koche 1/2—3/4 Std. im Dampf, filtra. Fülle in sterile Röhrchen zu je 10 ccm (s. S. 13), sterilisiere durch einmaliges Erhitzen im Dampf während 15—20 Min.

3 Die Neutralisation mit Lackmus als Indikator (S. 9) ist schwierig, weil nicht leicht zu entscheiden ist, wann blaues Papier eben nicht mehr gerötet wird Genauer, aber umständlicher ist die **Neutralisation mit Phenolphthalein als Indikator:** Man verdünne in einem Kölbchen 5 ccm Nährboden mit 45 ccm frisch hergestellter Aq. dest., koche 3 Min. über der Flamme, füge dazu 1 ccm Phenolphthaleinlösung (0,5 g Ph. solve in 100 ccm 50%igen Alkohols) und titriere mit 1/20 Normal-NaOH oder -HCl bis zu deutlicher Hellrotfärbung der Flüssigkeit. Nun setze zu der ganzen Nährbodenmasse nach Massgabe des Titrationsergebnisses soviel Normal-NaOH oder -HCl, dass die Reaktion vermutlich neutral wird. Titriere darauf wieder eine Probe des Nährbodens (5 ccm) wie oben und korrigiere eventuell die Reaktion der Nährbodenmasse. Koche das Substrat auf und prüfe wieder. Ist der Nährboden nun für Phenolphthalein neutral oder leicht alkalisch, so ist er für Lackmus stark alkalisch, da die in der Nährlösung vorhandenen Peptone und Diphosphate, die Lackmus gegenüber neutral oder alkalisch sind, sich gegen Phenolphthalein sauer oder neutral verhalten. Da erfahrungsgemäss die auf Lackmus neutral oder leicht alkalisch reagierenden Nährböden die für das Bakterienwachstum geeignetsten sind, so müssen die auf Ph. neutralisierten noch einen Zusatz von Säure erhalten Adde 1,5% (bis 2,5%, vermerke wieviel!) Normal-HCl, koche auf, filtriere, sterilisiere usw.

4. Ein Zusatz von 2—8% Glycerin. puris zu den Substraten vor der Sterilisation (besonders zu Agar — sogenanntes **Glyzerinagar** —) erhöht für manche Zwecke ihre Brauchbarkeit. (S. S. 54 Tuberkelbaz.)

Abfüllen und Sterilisieren der Nährböden.

Neue Reagenzgläser (üblich solche von 160 mm Länge, 16 mm Durchmesser) müssen vor Gebrauch mit angesäuertem 1 - 2% HCl enthaltendem) Wasser ausgekocht werden, da sie beim Erhitzen Alkali abgeben, wodurch die in ihnen enthaltenen Nährböden trübe und unbrauchbar werden können Man kauft am besten Röhrchen aus Jenenser Glas (Firma Schott-Jena), die wenig Alkali abgeben. Gebrauchte werden in Wasser oder Dampf ausgekocht. Man reinigt die Reagenzgläschen durch Ausbürsten sorgfältig, lässt sie austrocknen, versieht sie mit etwa 3 cm langen, fest hineingedrehten, über die Mündung etwas hinausragenden Wattepfropfen und sterilisiert sie im Trockenschrank gemäss S. 6 Ziff. 2 (die Sterilisation kann bei Röhrchen, die nachher, mit dem Nährsubstrat gefüllt, noch wiederholt sterilisiert werden, unterbleiben).

Zum Abfüllen versieht man einen Trichter unten mit einem Stück Gummischlauch, bringt in diesen ein kurzes Glasröhrchen, auf den Trichter ein Glasschälchen als Deckel und sterilisiert alles zusammen im Dampfstrom. Mittelst dieses Apparates, auf dessen Gummischlauch man einen Quetschhahn klemmt, füllt man etwa 5 ccm der Substrate in jedes Röhrchen ein. Man vermeidet durch diese Einfüllungsart das beim Eingiessen eintretende Beschmutzen des oberen Randes der Röhrchen, wo der Wattepfropfen nicht festkleben soll.

Zum Abfüllen bestimmter Mengen in Röhrchen benutzt man besondere Fülltrichter (Treskowsche) oder man versieht eine graduierte Bürette unten durch Schlauchverbindung mit einem ⅄- oder ⊥-förmigen Ansatzrohr, lässt durch dessen einen Schenkel von einem hochgestellten Kolben aus durch einen Gummischlauch die Nährflüssigkeit bis zur Marke 0 steigen, schliesst den Zufluss ab und füllt aus dem anderen Schenkel, der mit Gummischlauch, Glasrohr und Quetschhahn versehen ist, bestimmte Mengen ab. (Vor dem Sterilisieren der Röhrchen ist an einigen der Stand des Inhaltes durch Fettstiftstrich zu markieren, um zu kontrollieren, ob sich die Menge auch nicht nach dem Sterilisieren verändert hat!)

Die gefüllten Röhrchen sterilisiert man im Dampfstrom (der Regel nach drei Tage hintereinander je 1/4 Std., doch genügt, wenn Röhrchen und Abfüllvorrichtung sterilisiert waren, einmaliges Erhitzen für 1/4 Std.) und lässt dann Agar und Gelatine in gerader Stellung der Röhrchen erstarren oder in schräger Lage, das Ende der Röhrchen mit dem Wattebausch auf einen Bleistift, ein Glasrohr oder dergl. gelagert; die Lösung darf dabei nicht den Wattestopfen benetzen, weil dieser sonst später festklebt!

Peptonwasser.

Als Ersatz für Bouillon kann man vielfach eine Lösung von Pepton (Witte-Rostock) 1—2 % und NaCl 1/2—1 % in Aq. dest. (oder Aq. comm.) verwenden. Für bestimmte Zwecke (Indolreaktion S. 30) fügt man noch 0,01 % KNO_2 und 0,02 % krist. Soda zu. Sterilisieren wie bei den Fleischwassernährböden. (Gut für Cholera- und ähnliche Vibrionen, mässig für Typhus- und Kolibaz., schlecht für Diphtheriebaz. brauchbar.) — Für Wasseruntersuchungen bestimmter Art (s. S. 84) hält man sich zweckmässig eine konzentriertere Peptonlösung steril in Kolben vorrätig. (Pepton und NaCl $\overline{aa}$ 10,0, KNO_2 1,0, kristall. Soda 0,2, Aqua 100,0.)

Blutserumnährböden.

Von dem beim Schlachten eines Tieres (Rind, Hammel, Pferd) aus der Stichwunde am Halse spritzenden Blut fängt man in grossen, mit Sublimat, Alkohol und Äther nacheinander gereinigten Glaszylindern auf, die man 24 Std. an kühlem Orte stehen lässt. Mit steriler Pipette oder sterilem Heber wird dann das ausgeschiedene klare oder leicht blutig gefärbte Serum abgehoben und in sterile Reagenzgläser gefüllt. (Die Abscheidung des Serums befördert man, indem man den Blutkuchen einige Stunden nach dem Auffangen des Blutes mit sterilem Glasstabe von der Gefässwand lockert.)

Durch Erwärmen auf etwa 70° über längere Zeit hin lässt sich das Serum in eine ziemlich durchsichtig erstarrte Masse verwandeln, wobei sich etwas „Kondenswasser" ausscheidet; man wählt meist schräge Lage der Röhren in besonderen Serumerstarrungsapparaten.

Das so gewonnene Blutserum enthält stets sehr resistente Keime. Um keimfreie Serumröhrchen zu erhalten, kann man fraktionierte Sterilisation anwenden (siehe Seite 7

sub 4b), doch ist dieses Verfahren nicht ganz zuverlässig. Oder man stellt die erstarrten Röhrchen 24 Stunden in den Brutapparat und scheidet die durch Bakterienwachstum verunreinigten (Kondenswassertrübung, oft 50 % und mehr!) aus. Oder man füllt das Serum in Arzneiflaschen, versetzt es mit 1—2 % Chloroform und verschliesst mit Gummistopfen; dann ist es nach einigen Monaten Aufbewahrung (also Vorräte halten!) meist keimfrei (Chloroform durch Erwärmen verjagen!). Umständlich und langwierig ist die keimfreie Filtration von Serum (s. S. 7 sub 4c). Am sichersten ist es, das Blut keimfrei zu entnehmen, indem man selbst einem Hammel oder Kalb im Laboratorium eine sterile Kanüle, aseptisch operierend, in die Karotis bindet und das Blut durch einen an der Kanüle befestigten sterilen Gummischlauch in einen sterilen Kolben laufen lässt, dann wie vorbeschrieben weiter behandelt. Flüssiges Blutserum als Nährboden gewinnt man am zweckmässigsten auf diese Weise!

Für die meisten Zwecke kann man auf die geringe Durchsichtigkeit des erstarrten Serums verzichten und es sterilisieren, indem man es, nach dem Erstarren in schräger Schicht, drei Tage nacheinander je ½ Stunde lang im Serumerstarrungsapparat auf 95—98 ° erhitzt (oder auch im Dampfstrom auf 100 °, wobei jedoch die Substratoberfläche oft durch Blasenbildung uneben wird). Zur Vorsicht kann man vor Gebrauch die Röhrchen dann noch 24 Stunden bei 37 ° halten und verunreinigte (Kondenswassertrübung!) ausscheiden.

Statt in Röhrchen kann man Serum auch in Doppelschälchen (s. S. 20) erstarren lassen (und wie vor sterilisieren). Hier trocknet aber die Oberfläche schnell aus, auch finden sich oft fremde Keime ein.

Ebenso wie Serum kann man durch aseptische Punktion gewonnene **Ascites- und Hydrocelenflüssigkeit** zum Erstarren bringen oder als flüssiges Substrat benutzen. (Reaktion manchmal sehr stark alkalisch, stets prüfen!)

Blutserum mit Bouillonzusatz.

(Löfflersches Blutserum.)

Den Nährwert des Blutserums kann man dadurch erhöhen, dass man (vor dem Einfüllen in Röhrchen) zu 3 bis 4 Teilen desselben einen Teil leicht alkalischer Bouillon (bereitet mit 1 % Pepton, ½ % Kochsalz und 1 % Trauben-

zucker) zusetzt. Die Erstarrungsfähigkeit wird durch den Zusatz nicht beeinträchtigt, doch muss man höhere Temperaturen (90—95°) zur Erzielung guter Erstarrung verwenden.

Menschliches Serum

siehe sub Gonokokken Nr. 1 u. 2.

Blutserum-Agar.

Flüssiges steriles Blutserum wird auf 40—50° erwärmt und mit flüssigem, auf 40—50° abgekühlten Nähragar (mit 2—3 % Agargehalt) āā oder 1 : 2 gemischt. Erstarrt beim Abkühlen. Wird vor der Erstarrung besät und dann schnell zu Platten verarbeitet (S. 19—21) oder in schrägliegenden Röhrchen oder in Schälchen zur Erstarrung gebracht und dann an der Oberfläche besät (S. 23). Ebenso wird **Ascites-** oder **Hydrocelenagar** hergestellt. (S. auch S. 91 unter 3!)

Eier.

Die Schale des Eies wird sorgfältig abgeseift und abgebürstet, mit warmem ca. 5 %igen Sublimat und sterilem Wasser gewaschen und mit steriler Watte getrocknet. Zur Besäung macht man in die Spitze des Eies mit steriler Nadel eine kleine Öffnung, impft durch diese und verschliesst die Öffnung mit Siegellack oder sterilem Papier und Kollodium. Schlechter Nährboden, weil häufig nicht steril.

Erstarrtes Eiweiss (mit oder ohne Eigelb) in Schälchen oder Röhrchen stellt man her, indem man den Inhalt eines Eies nach Sterilisierung seiner Schale und Anlegung einer Öffnung an jedem Pole in sterile Schälchen oder Röhrchen ausbläst und im Serumerstarrungsapparat wie Serum erstarren lässt und sterilisiert. Will man Eiweiss und Eigelb getrennt haben, schlägt man die äusserlich sterilisierten Eier nach Hausfrauenart vorsichtig auf.

Kartoffeln.

1. Halbierte Kartoffeln mit Schale (Koch). Gute Salatkartoffeln werden mit der Bürste unter der Wasserleitung gründlich gereinigt. Nachdem die sog. Augen und die faulen Flecke mit dem Messer ausgestochen sind, werden die Kartoffeln ½ Stunde in 1 ‰ige Sublimatlösung gelegt. Darauf werden sie in Wasser abgespült, ¾ Stunden im Dampfapparat gekocht, mit sauberen Händen gefasst, mit sterili-

siertem Messer in der Zone des grössten Umfanges durchschnitten, auseinandergeklappt und in feuchten Kammern (grossen Doppelschalen mit wasserbefeuchtetem Fliesspapier am Boden) so, dass sich die einzelnen Kartoffelhälften nicht berühren, bewahrt. Besät wird das Zentrum der Schnittfläche.

An der Schale der Kartoffel sitzen viele die Kochung überlebende Sporen, von denen aus bald Entwicklung über die ganze Kartoffel statt hat, daher sind die beiden folgenden Verfahren, bei denen die Schale entfernt wird, vorzuziehen.

2. Kartoffelscheiben ohne Schale (v. Esmarch). Die wie bei 1 gereinigte Kartoffel wird geschält und in 1—2 cm hohe Scheiben zerlegt. Die Scheiben werden in sterile Doppelschälchen gebracht und im Dampf sterilisiert (am sichersten bei 110—120° 1 Std. lang, wobei die Kartoffeln allerdings bräunlich werden und schrumpfen, oder aber wiederholt bei 100° $^1/_4$—$^1/_2$ Std.).

3. Kartoffelkeile ohne Schale (Bolton, Globig). Mit einem weiten Korkbohrer sticht man aus der gereinigten Kartoffel, in der Richtung ihrer längsten Achse und nach Entfernung ihrer Schale an der Ein- und Ausbohrstelle, einen Zylinder aus, den man durch einen schrägen Schnitt mit sterilem Messer in zwei Keile zerlegt. Jeder Keil kommt mit der Basis nach unten in ein steriles Reagenzröhrchen, in dessen Kuppe ein Bäuschchen Watte oder ein Stückchen Glasrohr liegt, damit das Kartoffelstück nicht nach dem Kochen in dem dabei von ihm ausgeschiedenen Wasser steht. Sterilisieren wie bei 2.

4. Kartoffelbrei. Mit Wasser oder Milch zu Brei zerquetschte gekochte Kartoffeln werden in etwa 1 cm hoher Schicht in Erlenmeyersche Kolben gefüllt und im Dampf sterilisiert.

Kartoffeln reagieren sauer. Für manche säureempfindliche Bakterien erhöht sich ihr Nährwert, wenn sie in 3 %iger NaCl- oder 1 %iger Na_2CO_3-Lösung, die später vorsichtig abgegossen wird, gekocht werden. Glyzerinkartoffeln s. S. 54.

Brot.

Gedörrtes Graubrot wird fein zerrieben, davon soviel, dass der Boden bedeckt ist, in Erlenmeyerschen Kolben geschüttet und mit Wasser soweit übergossen, dass ein dicker Brei entsteht. Im Dampfstrom oder besser Autoklaven sterilisiert. Sauer reagierend, gutes Substrat für Schimmelpilze.

Milch.

Frische, auf Lackmuspapier amphoter reagierende, am besten durch Zentrifugieren entrahmte Milch wird in Reagenzgläschen gebracht und an drei aufeinanderfolgenden Tagen je $^1/_2$—1 Std. im Dampfstrom gekocht. (Temperaturen von 110° und darüber färben das Substrat bräunlich.) Vor Besäung behufs Prüfung der Sterilität mindestens 3 Tage bei 37° halten.

Eiweissfreie Nährlösung nach Uschinsky-C. Fränkel.

NaCl 5,0, Kalium- oder Natriumbiphosphat 2,0, Asparagin oder asparaginsaures Natrium 4,0, Ammon. lactic. 6,0 solve in Aqua commun. 1000,0. Neutralisieren und leicht alkalisieren mit NaOH, sterilisieren wie Bouillon.

Andere Nährsubstrate.

S. Abschnitt VI und Register.

Aufbewahrung von Nährböden.

Allgemeine Regel: Bei allen Nährbodenvorräten vermerke am Behälter Tag der Fertigstellung, Zusammensetzung, Reaktion!

Nährböden verderben bei der Aufbewahrung oft, besonders durch Austrocknen und, trotz dichten Watteverschlusses, durch Eindringen von Schimmelpilzen. Beides lässt sich verhüten, entweder indem man die Röhrchen und Kolben nach Absengen des Randes und des vorstehenden Teiles des Wattestopfens mit einer soeben im Dampfstrom gekochten dichtanschliessenden Gummikappe überzieht (oder einer sterilisierten Stanniolkappe oder einer Schmelzmetallkappe gemäss S. 114 sub 4); oder indem man die Nährböden in Flaschen mit dichtem Patentverschluss (z. B. von C. Raupert-Magdeburg) aufbewahrt; oder indem man die Nährbodengefässe in einer dicht verschliessbaren Blechschachtel (Cakesbüchse) zugleich mit einem mit Nelkenöl befeuchteten grossen Stück Fliesspapier oder Watte bewahrt.

Zu eingetrockneten Nährböden setze man das verdunstete Quantum Wasser wieder zu und sterilisiere aufs neue (gut durchmischen!). Nährböden mit beginnender Verschimmelung lassen sich ebenfalls durch erneute Sterilisation noch retten.

IV.

Die Kulturmethoden. Allgemeines.



Das Plattenverfahren.

Das Plattenverfahren dient zur Trennung der verschiedenen Bakterienarten in Bakteriengemischen. Die Keime werden, in einem flüssig gemachten Nährmedium verteilt, bei dessen Erstarren an verschiedenen Stellen festgehalten. Sie vermehren sich dann, wenn ihnen das Substrat zusagt, und bilden räumlich voneinander getrennte Kolonien.

1. Gelatineplatten: Man verflüssigt drei Röhrchen mit Nährgelatine im Wasserbade bei 30—35°. Eines davon (Nr. 1) fasst man mit der linken Hand derart, dass es zwischen Daumen und nach oben gekehrter Hohlhand mit der Mündung nach rechts in schräger Lage ruht, dreht den Wattebausch heraus und nimmt ihn zwischen zwei Fingerspitzen der linken Hand so, dass die zum Einführen in die Röhrchenmündung bestimmten Teile der Watte nach unten hängen und von den Fingern nicht berührt werden. (Die gleiche Haltung des Röhrchens beobachte bei allen Abimpfungen von Reinkulturen usw.!) Mit abgeglühter und wieder erkalteter Platinöse nimmt man nun eine Spur Bakterienmaterial auf und verreibt diese an der Glaswand mit dem obersten Teile der Gelatine im Röhrchen. Platinöse abglühen und fortstellen. Röhrchen mit dem Wattebausch verschliessen; Verteilen der Bakterieneinsaat in der Gelatine durch Drehen, Neigen und Wiederaufrichten des Röhrchens (nicht schütteln, weil die entstehenden Blasen später leicht Kolonien vortäuschen. Gelatine soll Wattebausch nicht berühren!).

Nun fasst man das Röhrchen wieder wie vor angegeben, öffnet es und nimmt das zweite Röhrchen ebenso daneben. Mit steriler Platinöse überträgt man drei Ösen Inhalt von Röhrchen 1 in Röhrchen 2, glüht die Öse ab und schliesst beide Röhrchen. Nr. 1 zurück in das Wasserbad. Nr. 2 mischen wie vorher Nr. 1 und von Nr. 2 drei Ösen Inhalt in Röhrchen 3 übertragen, dann dessen Inhalt mischen.

(Bei sehr bakterienreichem Material sät man weniger aus, überträgt von einem Röhrchen zum anderen nur 1—2 Ösen oder besät noch ein viertes und fünftes Röhrchen; ev. verzichtet man darauf, das Röhrchen 1, das dann statt Nährsubstrat steriles Wasser enthalten kann, zur Platte auszugiessen.)

Die Gelatine giesst man nach Abbrennen und Wiederabkühlung des Röhrchenrandes auf dem horizontal gestellten Giessapparate auf vorher trocken in genieteten Blechbüchsen sterilisierte Glasplatten aus und verteilt sie mit dem Rande des Glases so, dass rings ein ca. 1 cm breiter Rand auf der Glasplatte bleibt. Nach dem Erstarren der Gelatine bringt man die mit Nummern (1, 2, 3) beschriebenen Platten auf Glasbänkchen in grosse Doppelschalen, auf deren Boden man ein Stück feuchtes Fliesspapier legen kann. Die Platten dürfen nur so gross sein, dass man jede Stelle unter dem Mikroskop betrachten kann.

Besser als Platten sind sterile **Doppelschälchen** (sog. Petrischalen, flach, von 9—10 cm Durchmesser; grössere s. S. 75), da sie ohne Giessapparat gefüllt werden können (Deckel beim Eingiessen des Substrates nur an einer Seite ein wenig lüften), von Luftkeimen nicht so leicht verunreinigt werden und durch das Bakterienwachstum etwa flüssig werdendes Substrat nicht abfliessen lassen wie Platten.

Hat man weder Platten noch Schälchen zur Verfügung, so stellt man **Rollröhrchen** her. Man zieht eine Gummikappe über den Wattepfropf des Röhrchens, hält dieses fast horizontal unter den Strahl der Wasserleitung und bringt die Gelatine durch schnelles Drehen des Röhrchens rings an den Wänden gleichmässig zum Erstarren. Der Wattepfropf soll nicht von der Gelatine berührt werden. Es empfiehlt sich Röhrchen mit möglichst wenig Gelatine zu nehmen (höchstens 5 ccm) und diese vor dem Rollen bis nahe an den Erstarrungspunkt abkühlen zu lassen. Im Sommer rollt man in einer Schale mit Eiswasser. Cave das Berühren mit der warmen Hand beim Fortstellen! Wenig geeignet beim Vorhandensein stark verflüssigender Bakterien.

Alle Kulturen sofort deutlich und genau mit Fettstift oder (besser) mit Etiketten unter Datumangabe signieren!

2. **Agarplatten** werden genau wie Gelatineplatten aus verflüssigten, auf ca. 40° abgekühlten Nähragarröhrchen hergestellt (nur in Schälchen, nicht auf Platten, weil hier das Agar infolge Ausscheidung von Kondenswasser meist nicht fest haftet). Schnell arbeiten, weil Agar leicht erstarrt! (S. S. 11.) Schälchen vor Eingiessen leicht anwärmen. Rollröhrchen gelingen schlecht. Man bewahre Agarschälchen mit der Deckelseite nach unten auf, weil aus dem Agar ausge-

der-
lten
sser
len
and
ine
ten
ler
er
m

g
rt
n
e
t
.

presstes Kondenswasser anderenfalls leicht alle oberflächlich gelegenen Kolonien konfluieren lässt.

Über Herstellung von **Serumagar**platten vergl. S. 16.

Vorzüge der Gelatine: Kolonien meist in charakteristischen Formen wachsend.

Nachteile der Gelatine: Bleibt fest nur bis höchstens 30 ° (in üblicher Weise hergestellt nur bis 22—24 °, besonders in Platten), nicht bei Körpertemperatur. Schnelle Verflüssigung (Peptonisierung) durch manche Bakterien störend bei Isolierung auf Platten.

Vorzüge des Agars: Bei Körpertemperatur in festem Zustande zur Züchtung verwendbar. Keine Verflüssigung durch Bakterienwachstum, so dass Platten länger haltbar sind als solche von Gelatine.

Nachteile des Agars: Kolonien oft wenig charakteristisch wachsend.

Verdünnungen mit Verbrauch von wenig Gelatine oder Agars: Man bringt eine Anzahl von Bouillon- oder Gelatinetröpfchen auf eine sterile Platte oder die Innenseite des Deckels einer Petrischen Schale, besät den ersten Tropfen mit dem zu untersuchenden Materiale, von diesem den zweiten, von diesem den dritten etc. und von beliebigen Tropfen ein oder mehrere Gelatine- oder Agarröhrchen, die man dann zu Platten ausgiesst.

Die Untersuchung der Platten.

Die auf Platten entwickelten Kolonien untersucht man mit schwachem Objektiv, enger Blende und Hohlspiegel. Von Doppelschälchen hebt man den Deckel ab oder bringt sie, wenn man nicht abimpfen will, geschlossen mit der Bodenseite nach oben unter das Mikroskop.

Zur Abimpfung von einer bestimmten Kolonie dient das sogenannte **Fischen:** Man stellt die zu untersuchende, auf der Platte entwickelte Kolonie mit schwacher Vergrösserung ein, geht mit einer sehr feinen, kurzen, zweckmässig an der Spitze umgebogenen Platinnadel, ohne Mikroskopteile, Kulturapparat und Kultursubstrat mit ihr zu berühren, unter das Objektiv, wobei man den kleinen Finger der die Nadel haltenden Hand fest auf den Objekttisch stützt, und tupft mit der im Gesichtsfeld auftauchenden Nadelspitze unter Kon-

trolle des durch das Mikroskop schauenden Auges auf die Kolonie. Dann wird die Nadel ebenso vorsichtig wieder unter der Linse hervorgezogen. Das von der Kolonie abgerissene Material benutzt man zur Herstellung von Präparaten oder Reinkulturen.

Zu orientierender Untersuchung fertigt man **Klatschpräparate:** Auf die zu untersuchende Stelle der Platte legt man ein in der Flamme sterilisiertes und wieder abgekühltes Deckglas, drückt es fest an und hebt es dann mit einer senkrecht gehaltenen, an zwei gegenüberliegenden Kanten des Deckglases anfassenden Pinzette ab, um es nach den unter Färbemethoden S. 33 gegebenen Regeln zu behandeln. Geeignet für allgemeine Orientierung über die vorhandenen Koloniearten oder zur Untersuchung ganz kleiner nicht fischbarer, oberflächlich liegender Kolonien. — Von einer Plattenstelle, an der ein Klatschpräparat gemacht ist, darf nicht mehr zu Kulturzwecken abgeimpft werden, da beim Abklatschen die einzelnen Kolonien sich gegenseitig verunreinigt haben können.

Zählung von Keimen (s. S. 104 u. 110).

X

Herstellung und Fortzüchtung von Reinkulturen.

Herstellung aus Plattenkulturen: Man fischt (s. S. 21) etwas Material von einer isolierten Kolonie mit der Platinnadel und besät damit sterile Nährmaterialien in Röhrchen. In flüssigen Medien spült man die Nadel durch Hin- und Herbewegen ab. Auf festen undurchsichtigen Substraten streicht man sie an der Oberfläche mit einem Strich oder Hin- und Herfahren über die ganze Fläche ab; bei den in schräger Röhrchenlage erstarrten durchsichtigen verfährt man ebenso (**Strichkultur**); cave Zerkratzen der Oberfläche! Sticht man die Nadel in das in gerader Stellung des Röhrchens festgewordene durchsichtige Substrat ein, so entsteht eine **Stichkultur.** Will man das Wachstum im Stich unter dem Mikroskop (mit schwacher Vergrösserung) beobachten können, so macht man den Stich nahe der Wand des Röhrchens, sonst in dessen Mitte.

Fortzüchtung von Kulturen durch Übertragung einer kleinen Menge Materiales mit der ausgeglühten und vollkommen wieder erkalteten Platinnadel oder Öse auf neue Röhrchen mit Nährsubstrat. Haltung der Röhrchen dabei wie bei der Herstellung von Verdünnungen (vgl. S. 19) oder (nur Gelatineröhrchen!) mit der Mündung nach unten.

Zur Erhaltung der kultivierten Bakterien genügt in der Regel Übertragung alle 4—6 Wochen auf neue Nährböden, doch erfordern manche, namentlich pathogene Arten häufigere Übertragung (z. B. Influenzabaz., Gonokokken, Pneumokokken). Alte eingetrocknete Kulturen übergiesst man steril mit Bouillon, bebrütet 24 Std. und impft dann ab. — Monate lang halten sich auch empfindlichere Bakterien lebensfähig, wenn man kurze Seidenfäden (Turnerseide 4) mit Kulturen von ihnen oder (besser) mit Blut und anderen eiweisshaltigen Flüss., in denen sie enthalten sind, tränkt, die Fäden im Exsikkator über $CaCl_2$ in sterilen Schälchen trocknet und dann in kleinen Reagenzgläschen bewahrt, die in grösseren, am Boden $CaCl_2$ unter Watte enthaltenden, mit Gummikappe verschlossenen stehen.

Ersatz des Plattenverfahrens durch fraktionierte Aussaat.



Statt das bakterienhaltige Material im Nährboden zu verteilen, diesen dann zu Platten auszugiessen und ihn beim Erstarren die Keime fixieren zu lassen, kann man durch Ausstreichen des Bakterienmateriales auf der Oberfläche von Nährböden, die in Doppelschälchen oder schräg im Röhrchen erstarrt sind, die Vereinzelung der Keime vornehmen. Man verfährt dabei derart, dass man mit einer Öse, einem ausgeglühten Platinpinsel (dieser zerkratzt leicht die Oberfläche bei der Aussaat!) oder einem sterilen Wattebäuschchen das auszusäende Material aufnimmt und über die ganze Oberfläche des Substrates verstreicht. Von Schälchen genügt bei ihrer grossen Oberfläche oft eine zur Erzielung isolierter Kolonien, wenn man nicht gar zu viel oder zu bakterienreiches Material aussät. (Bei Aussaat mit der Öse tupfe man deren Inhalt auf eine Stelle der Oberfläche und verreibe mit dem parallel zur Substratoberfläche umgelegten Platindraht das Material über die ganze Fläche; auch winklig gebogene Glasstäbe eignen sich zum Verteilen auf Platten.) Schräg erstarrte Röhrchen muss man gewöhnlich zu mehreren hintereinander besäen. Hat der Nährboden in ihnen Kondenswasser ausgeschieden, so kann dieses als Verdünnungsflüssigkeit für das Bakterienmaterial dienen. So verfährt man z. B. bei Serumröhrchen derart, dass man mit der materialbeladenen Platinöse in das Kondenswasser eines Röhrchens fährt, sie darin abspült und über die ganze Fläche des Serums hin- und herstreicht,

dann mit derselben Öse sofort, ohne wieder das Ausgangsmaterial zu berühren, ebenso ein 2 oder 3. Röhrchen behandelt. Auf dem 2. oder 3. Röhrchen entwickeln sich dann meist isolierte Kolonien, von denen man Reinkulturen anlegen kann. — Bei Substraten, die man nicht beliebig oft aus dem festen Zustand in den flüssigen und wieder in den festen zurück verwandeln kann (so z. B. bei erstarrtem Blutserum, Kartoffeln), ist diese Methode die allein verwendbare für die Isolierung von Keimen.

Der Tierkörper als Reinkulturapparat.

Manche pathogenen Organismen kann man mit Hilfe des Tierkörpers aus Bakteriengemischen isolieren. Es ist dazu nötig, dass keine anderen für das Tier pathogenen und in dessen innere Organe eindringenden Keime in dem Gemisch vorhanden sind. Nach der Impfung (Technik S. 107) verbreitet sich nur die eine pathogene Organismenart durch den Körper und kann nach dem Tode des Tieres aus dessen inneren Organen rein gezüchtet werden. (Anwendbar z. B. zur Isolierung von Milzbrand-, Mäuseseptikämie-, Tuberkel-, Rotzbazillen, Pneumokokken) Bei Aussaaten aus Tierkadavern ist es meist besser, nicht gleich Reinkulturen, sondern erst Plattenkulturen anzulegen. Will man sofort Reinkulturen zu bekommen versuchen, so mache man keine Stich-, sondern Strichkulturen, in denen sich leichter etwaige fremde Kolonien bemerken lassen, niemals Aussaaten in flüssige Substrate, weil hier Verunreinigungen oft schwer erkennbar sind,

Kulturen im hängenden Tropfen

von Bouillon, Gelatine etc. macht man zur direkten Beobachtung des Wachstums der Bakterien. Art der Anlage s. S. 1 u. 3.

Kultur der Anaerobien.

Den zur Kultur der Anaerobien bestimmten Nährböden setzt man praktisch 1—2 % Traubenzucker zu, auch wohl 0,3—0,5 % ameisensauren Natrons oder 0,1 % indigodisulfonsauren Natriums (färbt blau, wird beim Wachstum von Bakterien gewöhnlich durch Reduktion entfärbt — vgl. S. 30 sub 4).

Viele Anaerobien sind Sporenbildner. Man untersuche mikroskopisch das Material, aus dem sie isoliert werden sollen; findet man die Anaerobien (die dann meist an ihren

Fo
Er
die
mi
sch
hai
an

W
St
K
B
ba

S

g
a
a

Formen erkennbar sind) Sporen tragend, so kann man durch Erhitzen des ausgesäten Materiales für 1/2 Std. auf 55—70° die vegetativen Formen fakultativer Anaerobien, die man nicht mitzüchten will, abtöten, ohne die obligaten Anaerobien zu schädigen, und kann so ev. diese sofort in Reinkulturen erhalten. Stets aber auch Kulturen von unerhitztem Materiale anlegen!

Als Kulturmethoden empfehlen sich folgende:

1. Züchtung ohne Luftabschluss (Tarozzi, Wrzosek, C. B. I. Or. 38 S. 619, 43 S. 17): In Bouillon Stücke von Tier-Leber, -Milz, -Nieren, gekochtem Ei oder Kartoffeln bringen, nicht zu klein, etwa 1 g auf 10 ccm Bouillon. Sterilisieren im Autoklaven bei 120°, möglichst bald nach Sterilisation besäen.

2. Züchtung mit mechanischem Sauerstoffabschluss:

a) Kultur in hoher Schicht. Reagenzgläschen, zu 3/4 mit Nährgelatine oder Agar gefüllt, werden tüchtig gekocht, durch Kühlung in Wasser ohne Umschütteln schnell abgekühlt und besät. Zur Isolierung geeignet, wenn man das auszusäende Material im eben noch flüssigen Substrate, ohne dabei Luft durch Schütteln hinein zu bringen, gut verteilt und Verdünnungen wie beim Plattenverfahren durch Beimpfung weiterer 2—3 Röhrchen anlegt. Nach dem Erstarren giesst man vorsichtig (nach Abbrennung der Röhrchenmündungen) den flüssig gemachten, aber höchstens noch einige 40° warmen Inhalt eines zweiten und dritten Röhrchens hinein (auch auf Gelatine am besten nicht Gelatine, sondern Agar aufgiessen). Zur Untersuchung und Isolierung der entwickelten Kolonien zertrümmert man das Glas und zerteilt das Substrat an der gewünschten Stelle mit sterilisiertem Messer; oder man impft ohne Zertrümmerung des Glases von oben her mit langer Nadel oder einem soeben in der Flamme zu einer feinen Kapillare ausgezogenen Glasröhrchen von einer isoliert liegenden Kolonie ab.

Fortzüchtung von Reinkulturen durch Stichkulturen (Stich bis in die tiefsten Schichten reichend!) in Röhrchen, die zu 3/4 mit Nährsubstrat gefüllt und frisch aufgekocht sind.

Auf die Oberfläche kann man steriles Öl giessen, um das Wiedereindringen der durch das Kochen verdrängten Luft in den Nährboden zu verhüten. Unter 3 cm hoher Öl-,

Paraffin. liquid.- oder Vaselineschicht wachsen viele Anaerobier auch in flüssigen, frisch ausgekochten Substraten (Unsaubere Methode, bei Fortimpfungen stört das Fett!) — Weitere Modifikationen s. bei Ghon und Sachs, C. B. I. Or. 32. S. 403.

Auch im geschlossenen Schenkel von Gärröhrchen (s. S. 29) vermögen Anaerobien zu gedeihen, ebenso in anderen Gärgefässen (s. S. 29 Abs. 3 am Ende).

b) Man entfernt die Luft mittelst der Luftpumpe (Gruber). Das besäte Röhrchen wird in ein Wasserbad von 30—35° (Agar 42°) gesetzt. Durch den das Röhrchen verschliessenden paraffinierten Gummistopfen geht ein dicht unter dem Stopfen endendes Glasrohr, das mit der Luftpumpe in Verbindung gesetzt wird. Das Nährsubstrat gerät im luftverdünnten Raum ins Sieden, nach etwa ¼ Std. ist alle Luft ausgetrieben, worauf das Saugrohr an einer vorher ausgezogenen Stelle zugeschmolzen wird. Gelatine kann man schliesslich wie im Rollröhrchen (s. S. 20) verteilen. — Die Methode mit 3. kombiniert vgl. Emmerling, Hyg. Rdsch. 1904, S. 452.

3. Methode mit Absorption des Sauerstoffes (Buchner): Man setzt die besäten Röhrchen oder Schälchen (diese offen, übereinander, durch Glasleisten voneinander getrennt) in ein luftdicht verschliessbares Glasgefäss (z. B. in ein weites Reagenzglas mit paraffiniertem Gummistopfen oder in einen Exsikkator). Auf dessen Boden oder in ein offenes Schälchen in ihm bringt man Pyrogallussäurelösung und setzt im letzten Augenblick vor dem Schliessen des Gefässes mit einer Pipette Kalilauge dazu. Die alkalische Pyrogalluslösung absorbiert den Sauerstoff. Für 100 ccm Luft rechnet man nach Buchner 1 g Pyrogallussäure (gelöst in 2—3 ccm Wasser) und 10 ccm folgender Kalilauge: Liquor. Kal. caust. (15 %ige KHO) 1,0, Aq. 10,0 oder nach Hammerl 2 g Pyrogallussäure gelöst in 1,5 ccm 50 %iger KHO. Die völlige Absorption des O beansprucht bei Brütwärme etwa 24 Stunden; setzt man die Lauge heiss zu, erfolgt sie schneller. Doppelschalen für O-Absorption eingerichtet s. Schüler, C. B. I. Or. 37 S. 298 u. Dreuw, ebda. 36 S. 748; Absorption mit Phosphor s. Sellards, ebda. 37 S. 632.

4. Methoden mit Verdrängung des Sauerstoffes durch Wasserstoff:

a) Mit Durchleitung von Wasserstoff. (Fränkel-Hueppe.) Durch eine Bohrung im Gummistopfen des mit

Nährsubstrat beschickten und besäten Kulturkolbens oder Röhrchens reicht ein über dem Stopfen rechtwinklig geknicktes Glasrohr tief in die Nährflüssigkeit, durch die andere Bohrung geht ein gebogenes Glasrohr bis dicht unterhalb des Stopfens. (Spritzflaschenkonstruktion!) Durch das erste Rohr wird reiner, in JK-lösung und in Pyrogallussäurelösung + KOH gewaschener H von einem Kippschen Apparate zugeleitet, so lange bis das Gas, das aus der in eine feine Spitze ausgezogenen Mündung der anderen Röhre ausströmt, angezündet mit ruhiger kleiner Flamme abbrennt. Dann wird, während der H weiterströmt, zuerst diese Mündung, darauf das zuleitende Glasrohr zugeschmolzen. Der Gummistopfen kann zwecks besseren Luftabschlusses mit geschmolzenem Paraffin übergossen werden. Aus Gelatinekulturen kann man nach beendetem Durchleiten des H Rollröhrchen (s. S. 20) machen.

Cave wegen Explosionsgefahr zu zeitiges Anzünden des ausströmenden Gases! Am besten hält man ein kleines Reagenzglas über die Ausströmungsöffnung und entzündet dessen Inhalt, wenn man annehmen kann, dass alle darin enthalten gewesene Luft verdrängt ist, über der Flamme. Brennt das Gas ruhig unter ganz geringem Puffen ab, so war es reiner Wasserstoff; man kann dann das ausströmende Gas anzünden. Oder man leitet das Rohr in Seifenwasser und wartet, bis die Seifenblasen angezündet nicht mehr knallen.

Modifikation der Methode für Kulturen in Schälchen (Blücher): In eine genügend grosse Glasschale füllt man etwa 1 cm hoch Pyrogallussäurelösung und setzt in ihre Mitte, auf einem Drahtgestell erhöht, das besäte Kulturschälchen mit Agar oder Gelatine ohne Deckel. Über das Schälchen stülpt man einen Trichter derart, dass sein Rand rings in das Paraffin eintaucht, und beschwert ihn mit einem Bleigewicht. Durch das Rohr des Trichters wird H durchgeleitet, der die Luft unter dem Trichterrand hervordrängt. Nach längerer Durchleitung klemmt man den das Gas zuleitenden Gummischlauch über dem Trichterrohr mit einem Schrauben-Quetschhahn zu, schneidet den Schlauch über der Klemme ab und füllt den Schlauchrest über dem Quetschhahn mit Paraffin. liq. Endlich lässt man mittelst Pipette noch KOH (vgl. S. 26 sub 3) zu der Pyrogalluslösung hinzufliessen und giesst zwischen Schale und Trichterrand etwas Paraffin. liquid. — Grosse Apparate für viele Kulturen von Botkin (Zschr. f. Hyg. Bd. 9) u. Novy (C. B. 16).

b) Mit Einleitung von Wasserstoff (Fuchs). Das besäte Röhrchen mit Nährsubstrat wird mit der Mündung nach unten in einen Halter eingeklemmt (bei Agar und Serum das Kondenswasser vorher abgiessen) und geöffnet. Nun leitet man einige Minuten lang Wasserstoff ein, indem man eine mit dem H-Entwickler verbundene Glasröhre bis in die Kuppe des Röhrchens einführt. Allmählich senkt man die Röhre bis zur Mündung des Reagenzglases und schliesst dieses dann in derselben Haltung sehr schnell fest mit einem sterilen Gummipfropfen, worauf die Gläschenmündung in verflüssigtes Paraffin getaucht wird. Aus diesem herausgenommen wird das Röhrchen auf dem Pfropfen stehend aufbewahrt. Benutzt man die Methode für schräg erstarrte Agarröhrchen, so wähle man ein etwas hoch konzentriertes, nicht zu frisches Agar mit einem Gehalt von $^1/_2$ % Gummi arabicum, damit der Nährboden nicht allmählich auf den Stopfen hinabrutscht und sich dort zusammenballt. — Kann zur Isolierung von Anaerobien in fraktionierter Aussaat (s. S. 23) dienen.

Verfahren zum Studium besonderer Lebenseigenschaften der Bakterien.

1. **Untersuchung auf Sauerstoffbedürfnis.** Man lege Kulturen nach einer der Anaerobienzüchtungsmethoden an. Obligat aerobe Bakterien versagen dann das Wachstum. (Zugleich den selben Nährboden bei Luftzutritt besäen!) Einfachste Proben: Ob Entwickelung im geschlossenen Schenkel des Gärröhrchens (s. sub 2) und bei Kultur in hoher Schicht (s. S. 25 sub 2a) in den tiefsten Teilen des Substrates auftritt

2. **Untersuchung auf Gärungsvermögen.** Als Substrat dienen Nährmedien mit einem Gehalt von etwa 0,25—0,5 % Trauben- (ev. anderem) Zucker (vgl. S. 9 Nährbouillon unter 1!). Die Nährböden sollen von anderem Zucker als dem absichtlich zugesetzten frei sein. Man stelle daher, falls es sich um Bouillonsubstrate handelt, diese aus altem, etwas faulem Fleisch her. Dann prüfe man eine Probe der Bouillon mit Bact. coli Einsaat im Gärröhrchen (s. unten) auf Zuckergehalt; ist vergärbarer Zucker vorhanden, so besäe man die Bouillon mit Bact. coli, bebrüte 6—12 Std. bei 37°, koche auf, filtriere (ev. nach S. 8 Nr. 4c), prüfe aufs neue im Gärröhrchen mit Coli und wiederhole, wenn noch Gasentwickelung erfolgt, die Prozedur. Schliesslich Neutralisation und Zusatz der zu prüfenden Zuckerart. Man neutralisiere

mit Natronlauge oder Dinatriumphosphat, nicht mit Natriumkarbonat, weil sonst eventuell durch stärkere, beim Bakterienwachstum entstehende Säure die CO_2 in Bläschen ausgetrieben werden kann und dadurch Zuckervergärung vorgetäuscht wird.

In festen zuckerhaltigen Nährböden bilden sich beim Wachstum gärungserregender Organismen (Aussaat in Stichkultur oder durch Verteilung im verflüssigten Substrate) Gasblasen, die den Nährboden zerreissen.

Als besondere Kulturapparate benutzt man V-förmig gebogene Glasröhrchen (oder sogenannte Gärungskölbchen), deren einer, längerer Schenkel geschlossen ist und ganz mit der gewählten gärungsfähigen Nährflüssigkeit gefüllt sein muss; in ihm sammelt sich das bei der Gärung entwickelte Gas. Der offene, mit Wattebausch versehene Schenkel soll nur ganz wenig Flüssigkeit enthalten oder eine kugelförmige Erweiterung über dem Flüssigkeitsspiegel besitzen, da er beim Eintreten von Gärung die vom Gas verdrängte Flüssigkeit aufnehmen muss. — Man kann auch Bouillonröhrchen bis dicht unter die Mündung füllen und mit einem Gummistopfen versehen, dessen Unterfläche die Bouillonoberfläche berührt und durch dessen Bohrung ein etwa 30—40 cm langes oder, wenn kürzer, oben kugelförmig erweitertes, mit Wattebausch verschlossenes Glasrohr bis tief in die Bouillon hinabführt. Das sich entwickelnde Gas sammelt sich unter dem Pfropfen und drängt die Bouillon in dem Glasrohr in die Höhe. (Auch zur Anaerobienzüchtung brauchbar, wenn Pfropfen und Bouillon sich ohne Lufteinschluss berühren.)

3. Untersuchung auf Alkali- und Säurebildung.

Qualitativ: Am einfachsten Prüfung der Reaktion bewachsener und zum Vergleiche auch unbesäter Proben desselben Nährbodens durch Tüpfeln auf Lackmuspapier. Quantitativ: Titrieren abgemessener Mengen mit $^1/_{10}$ oder auch $^1/_{100}$ Normal-Säure oder -Lauge mit Lackmus oder Phenolphthalein als Indikator.

Zur Sichtbarmachung der im Nährboden durch das Wachstum von Bakterien erfolgenden Reaktionsveränderung kann man dem Substrat einen geringen Zusatz von Lackmustinktur oder Azolitminlösung 1 : 100 Aq. geben und die Reaktion so einstellen, dass ein Tropfen $^1/_{10}$ Normal-Säure- oder -Alkalizusatz deutliche rote oder blaue Färbung gibt; dann sterilisieren (ändert sich die Reaktion dabei, sie korrigieren, dann nochmals sterilisieren) und besäen. Oft

wird der Lackmusnährboden, besonders in den tieferen Schichten, durch Reduktion (vgl. auch S. 30 sub 4) des Farbstoffes beim Wachstum der Bakterien entfärbt. Dann versuchen, ob beim Schütteln des Substrates (Sauerstoffaufnahme!) die Farbe wiederkehrt.

Reaktionsveränderung ist ferner sichtbar in Petruschkys Lackmus-Molke: Milch wird auf etwa 40—50° erwärmt, mit Aq. commun. $\overline{aa}$ und soviel (nicht zuviel) verdünnter Salzsäure versetzt, dass alles Kasein ausfällt. Abfiltrieren vom Niederschlag. Neutralisieren des Filtrates mit Sodalösung (genau!), 1—2 Std. kochen im Dampf, filtrieren bis zur Klarheit (eventuell Reaktion korrigieren) — Farbe soll wasserhell bis grünlichgelb sein —, sterile Lackmustinktur bis zur Violettfärbung zusetzen, abfüllen, sterilisieren.

Weitere gefärbte Nährböden zum Nachweis von Reaktionsveränderungen s. unter Typhus- u. Ruhrbaz. S. 66 ff. u. 80.

Bei Agar und Gelatine ist auch Hinzufügen fein geschlämmter sterilisierter Kreide zum Nährboden vor Besäung empfehlenswert. Durchsichtigwerden des Mediums in der Umgebung einer aufgehenden Kolonie oder Kultur beweist durch sie erfolgte Säurebildung.

4. **Untersuchung auf Reduktionsvermögen.** Züchtung auf Nährsubstraten mit Zusatz von farbigen, durch Reduktion leicht entfärbten Substanzen, wie indigodissulfonsaures Natrium (S. 24 Abs. 4), Lackmus (S. 29 unten), Methylenblau (von diesem nicht mehr als 1—2 Tropfen 1 %iger Lösung auf 100 Nährsubstrat, da sonst Entwickelungshemmung zu befürchten!). Entfärbung tritt nur in den der Luft nicht zugänglichen Nährbodenteilen ein, daher eignen sich anaerobe Kulturen und feste Substrate zur Beobachtung der Reduktion am besten. Durch Reduktion farblos gewordene flüssige Substrate gewinnen beim Schütteln mit Luft ihre Farbe wieder.

5. **Untersuchung auf Schwefelwasserstoffbildung.** Man setzt dem Nährboden etwa 3 % Eisentartrat zu (frisch durch Versetzen von $FeCl_3$-Lösung mit KOH gefälltes $Fe(OH)_3$ wasche aus, presse in Tuch aus, löse in Weinsäure, adde der fertigen Nährgelatine, sterilisiere im Dampf); oder man klemmt ein Stückchen angefeuchteten Bleipapiers unter den Wattepfropfen, so dass es in das Röhrchen hineinragt; oder man befeuchtet das untere Ende des Wattebausches in der Röhrchenmündung mit aufgekochter Blei-

zuckerlösung. Eine Schwärzung des Nährbodens oder des Papiers oder des Wattebausches zeigt H_2S-Bildung an.

6. Untersuchung auf Indolbildung.

1. Nach Kitasato-Salkowski. Füge zur Reinkultur in Bouillon oder Peptonwasser 1 ccm ca. 0,01 %iger Kaliumnitritlösung und 1 ccm reinste Schwefelsäure (1 + 3 Aq. dest.). Rotfärbung innerhalb 5 Minuten zeigt Indolbildung an. — Manche Bakterien bilden Indol und reduzieren zugleich im Pepton enthaltene (oder eigens zugesetzte) Spuren von Nitraten zu Nitriten (Choleravibrio und ähnliche). Ihre Kulturen geben daher Rotfärbung bei Zusatz von Schwefelsäure allein (ohne KNO_2 Zusatz) — sog. Nitrosoindolreaktion.
2. Nach Ehrlich (Böhme, C. B. I. Or. 40 S. 129). Zu 10 ccm flüssiger Kultur 5 ccm Lösung a), dann 5 ccm Lösung b), Schütteln. Bei Indolbildung Rotfärbung binnen 5 Min. Empfindlicher als Verfahren 1. Lösung a): Paradimethylamidobenzaldehyd 4 + 96 %igen Alkohol 380 + konzentr. HCl 80. Lösung b): Gesätt. wässer. Lösung von Kaliumpersulfat ($K_2S_2O_8$).

7. Untersuchung auf Proteinochrombildung. Kulturen in 5 %iger Peptonbouillon oder 3 %igem Peptonwasser werden mit Essigsäure leicht angesäuert und dann tropfenweise mit frisch bereitetem gesättigten Chlorwasser versetzt (oder mit etwas Chlorwasser überschichtet). Rotviolette Färbung (oder bei Überschichtung rotvioletter Ring an der Berührungsfläche) zeigt Proteinochrombildung an. (Erdmann u. Winternitz, M. M. W. 1903 S. 982.)

8. Untersuchung auf Lichtentwickelung (Phosphoreszenz). Züchtung häufig vorteilhaft auf stark (1—3 %) kochsalzhaltigen Medien in oberflächlicher Schicht (weil Luftzutritt nötig). Betrachtung der Kulturen im dunklen Raume mindestens einige Minuten, da Lichtschein oft erst allmählich wahrnehmbar wird. Manche Arten leuchten nur in ganz jungen Kulturen und kurze Zeit.

9. Untersuchung auf Resistenz gegen Erhitzen und Austrocknen. Resistenz gegen Erhitzen im feuchten Zustande. Man lässt gut entwickelte flüssige Reinkulturen in sterile Kapillaröhrrchen aufsteigen, schmilzt diese an einer oder beiden Seiten zu und setzt sie im Wasserbade oder Dampfstrom der zu erprobenden Temperatur eine bestimmte Zeit aus. Die darauf mit Sublimat, Alkohol und

Äther abgewaschenen Kapillaren werden mit steriler Pinzette in Röhrchen mit geeigneter Nährlösung geworfen und darin mit sterilem Glasstabe zertrümmert. Beobachtung auf Wachstum stets mehrere Tage lang. Sporen vertragen stets 60° über $^{1}/_{2}$ St. lang, meist 80° 10 Minuten lang. — Auch ganze Bouillonkulturen kann man wie vorgeschrieben erhitzen; sie müssen bis über ihr Flüssigkeitsniveau in das Wasserbad eintauchen; Thermometer in ein Röhrchen zur Kontrolle des Temperaturganges! Nach Erhitzen schnell abkühlen! Ehe man von ihnen aus andere Röhrchen beimpft, bebrütet man sie zweckmässig einige Tage lang bei geeigneter Temperatur; dabei haben etwa noch überlebende vereinzelte Keime Gelegenheit, sich zu vermehren und sind dann bei (reichlicher) Abimpfung auf frische Bouillon leicht nachweisbar.

Resistenz gegen Austrocknen: Kulturmaterial (Bouillonkultur oder fein und gleichmässig aufgeschwemmtes Bakterienmaterial von Kulturen auf festem Substrat) an sterile Deckglassplitterchen, Granaten oder Hornstäbchen in sterilem bedeckten Schälchen antrocknen lassen, von Zeit zu Zeit Aussäen in Nährlösung. Auch zur Prüfung der Wirkung trockenen Erhitzens geeignet. Ebenso kann man sterile Seidenfädchen mit Kulturmaterial tränken, trocknen lassen und zur Prüfung der Resistenz gegen Trockenheit, trockene Hitze, Dampfwirkung (in Fliesspapierhülsen eingeschlossen für bestimmte Zeit in den Dampfapparat bei 100° heissem Dampf gehängt etc.) benutzen. (Milzbrandsporenfäden s. S 54.)

10. Untersuchung auf Resistenz gegen chemische Desinfektionsmittel. Entwickelungshemmende Kraft von Desinfektionsmitteln festzustellen durch Züchtung auf Nährböden mit bestimmtem Gehalt des Desinfektionsmittels.

Abtötende Wirkung von Desinfektionsmitteln am einfachsten zu prüfen durch Einlegen an geeigneten Gegenständen (s. oben Abs 2) angetrockneter Bakterien in verschieden starke Lösungen über wechselnde Zeit. Vor Aussaat in Nährlösungen Abspülen in sterilem Wasser oder Auswaschen in einer das Desinfiziens bindenden, selbst nicht desinfizierenden Lösung, oder aber Aussaat in reichlich Nährlösung unter kräftigem Umschütteln.

11 Untersuchung auf Pathogenität s. S. 107 ff.

12. Untersuchung auf Giftbildung. Gift kann entweder im Nährsubstrat gelöst oder in den Bakterienleibern

enthalten sein. Gelöste Gifte im Substrat: Kulturen in flüssigen Medien keimfrei filtrieren (s. S. 7 sub 4 c), Filtrat Tieren applizieren (vgl. S. 108). Gifte in Bakterienleibern: Kulturen auf festem Substrat durch Chloroform- oder Toluoldämpfe abtöten. (Einige Tropfen Chloroform oder Toluol auf die Unterseite des Wattepfropfens träufeln, Röhrchen mit dem Wattepfropfen und doppelter Gummikappe schliessen, eine bis mehrere Stunden im Brutapparat bei 37° halten; Vorsicht, dass andere Kulturen im Brutschrank nicht leiden!), dann ohne Substratbeimischung auf Tiere verimpfen; zugleich durch Aussaat auf Substrat prüfen, ob alle Keime abgetötet sind! (Dosieren des Impfmaterials vgl. S. 109.)

V.

Die Färbemethoden. Allgemeines.

Herstellung der Präparate.

1. Ausstrichpräparate.

Ausstrich: Auf ein sauber geputztes Deckgläschen (Objektträgerausstriche s. S. 36) bringt man mit der Platinöse ein Tröpfchen Wasser und überträgt in dieses ein wenig von dem zu untersuchenden Materiale mit Platinöse oder -Nadel. Nun verteilt man das Tröpfchen in gleichmässiger dünner Schicht über das Deckgläschen (das völlig fettfrei sein muss, damit dies gelingt, — Reinigung s. S. 5) und lässt das Präparat lufttrocken werden, was man durch leichtes Erwärmen des, zweckmässig zwischen zwei Fingern an den Kanten gehaltenen Deckglases mit der bestrichenen Seite nach oben über der Flamme beschleunigen kann.

Flüssigkeiten, welche nicht zu zahlreiche Bakterien enthalten, Blut, Eiter bringt man direkt ohne Wassertröpfchen auf das Deckglas (Blut s. auch S. 101!). Von Organen reisst man mit steriler Pinzette Stückchen ab und streicht damit über das Deckglas, oder man drückt das Gläschen leicht auf eine Organschnittfläche. Schwer ausstreichbare Substanzen, wie zähe Sputa, Geschwulstknoten, manche Bakterienkulturen es sind, kann man auch zwischen zwei Deckgläschen, die man darauf mit 2 Cornetschen Pinzetten voneinander zieht,

zerquetschen. Vorsicht, dass die Finger nicht beschmutzt werden! (Klatschpräparate s. S. 22.)

Fixierung: Das lufttrockene Deckgläschen fasst man mit zwei Fingern (wenn der Rand nicht beschmutzt ist, sonst mit der Cornetschen Pinzette) an den Kanten und zieht es, mit der bestrichenen Seite nach oben, dreimal langsam durch die Gas- oder Spiritusflamme. Man muss dabei ein leichtes Brennen an den Fingern fühlen, dann ist die richtige Temperatur erreicht. Das so fixierte Deckgläschenpräparat kann man zu beliebiger Zeit färben.

Schonender und z. B. für Blutpräparate vorzuziehen ist Fixierung in Alkohol absol., auch + Äther $\overline{aa}$, für 2—10 Min. und länger. Für Darstellung feiner Gebilde ist Fixierung mit Osmiumsäure angebracht: In kleinem Schälchen, das mit Drahtnetz bedeckt in grösserer Glasdose mit fest schliessendem Deckel steht, 5 ccm 1 %iger Osmiumsäure (ev. + 10 Tropfen Eisessig bei Blutpräparaten). Auf Drahtnetz mit bestrichener Seite nach unten noch feucht Deckglasausstrich $^1/_2$—2 Min. legen, danach ev. Abspülen in ganz schwacher $KMnO_4$lösung. Dann trocknen an Luft und färben. Drahtnetz jedesmal nach Gebrauch ausglühen! Osmiumsäurelösung bleibt mehrere Wochen wirksam.

Ist man im Zweifel, welche Deckglasseite bestrichen ist, so hauche man auf das Glas — die unbestrichene Seite erscheint dabei gleichmässig matt (beschlagen), die bestrichene nicht — oder versuche, auf welcher Seite eine feine Nadel etwas von der Schicht abzukratzen vermag.

Färbung: Zum Färben fasst man das Deckgläschen in eine für gewöhnlich schliessende, bei Druck sich öffnende (Cornetsche) Pinzette, gibt soviel Farblösung mit einer Pipette (diese soll das Deckglas nie berühren!) darauf, dass das ganze Deckgläschen schwappend bedeckt ist und färbt bei einfachen Färbungen (Lösungen s. S. 40 ff.) 5 Minuten in der Kälte oder 10—60 Sekunden unter Erwärmen über der Flamme. Zur Färbung kann man die Deckgläschen auch mit der bestrichenen Seite nach unten auf Uhrschälchen mit Farbstoff, eventuell unter Erwärmen der Schälchen (auf Dreifuss mit Drahtnetz) schwimmen lassen. (Bequem bei lange dauernden Färbungen.)

Abspülung: Bei einfachen Färbungen spült man darauf mit Wasser (destilliertes hier nicht erforderlich) ab, legt das Gläschen mit der gefärbten Seite nach unten auf einen Objektträger und wischt seine Oberfläche, indem man eine Ecke

des Gläschens mit einer Fingerspitze fest auf den Objektträger drückt, sorgfältig mit Fliesspapier auf. Darauf wird mikroskopisch untersucht (vgl. S. 1 ff.).

Sieht man Teilchen des Präparates sich bewegen und umherschwirren, so ist dies ein Zeichen, dass nicht genügend in der Flamme fixiert oder zu stark abgespült worden ist.

Verdunstet während der Untersuchung das Wasser zwischen Deckglas und Objektträger, so setzt man einen Tropfen Wasser an den Rand des Deckglases, der sich schnell zwischen beiden Gläsern verbreitet.

Soll das Deckgläschen nach der Färbung noch mit anderen Flüssigkeiten behandelt werden, so bringt man diese direkt auf das Deckglas oder in Likörgläser (mit flachem Boden) oder dergl., in die man das Deckglas eintaucht.

Einlegen der Präparate: Statt in Wasser kann man Deckglaspräparate auch in Immersionszedernöl oder Kanadabalsam untersuchen. Man stellt das Deckgläschen senkrecht, an irgend einen Gegenstand gelehnt, auf Fliesspapier und wartet bis es trocken geworden ist oder man trocknet das gefärbte und abgespülte Deckgläschen vorsichtig zwischen Fliesspapier (nur drücken, nicht wischen, weil sonst Teile der Schicht verloren gehen! Abpinseln der Fliesspapierfasern mit trockenem Pinsel). Dann gibt man ein Tröpfchen Immersionszedernöl oder in Xylol gelösten, dickflüssigen Kanadabalsam auf die gefärbte Seite des Deckglases und kippt es mit dieser nach unten auf einen sauberen, trockenen Objektträger. Über den Rand des Deckgläschens soll Balsam oder Öl nicht hervorquellen; ev. entfernt man den Überschuss nach einigen Tagen, wenn er starr geworden ist und das Deckglas bereits fest an dem Objektträger haftet, mittelst xylolbefeuchteten Fliesspapiers; ebenso beseitigt man auf dem Deckglas zurückgebliebenes Öl. — Kanadabalsam zieht oft allmählich die Farben aus; daher ist Immersionszedernöl besser für aufzubewahrende Präparate. Sofort etikettieren!

Will man in Wasser untersuchte Deckgläschen zur Aufbewahrung einlegen, so wischt man zunächst mit Fliesspapier das Immersionsöl von ihrer Oberseite, schwemmt sie dann, indem man rings um ihren Rand reichlich Wasser auf den Objektträger bringt, von diesem ab, lässt trocknen und legt ein wie oben beschrieben.

Präparate auf Objektträgern: Wie auf Deckgläschen kann man auf Objektträgern Trockenpräparate herstellen. Empfehlenswert, wenn man viel Material auf einmal färben und untersuchen will. Fixierung und Färbung der Schicht wie bei Deckgläschen. Zur Untersuchung Trocknung der Schicht mit Fliesspapier oder an der Luft, Auftropfen von Immersionsöl und Untersuchung ohne Deckglas. Falls Konservierung erwünscht, die wichtigste Stelle mit Deckglas bedecken.

Bestimmung der Grösse von Bakterien ungefähr durch Vergleich mit roten Blutkörperchen möglich (diese haben 7—9 μ Durchmesser); sind solche nicht vorhanden (z. B. in Kulturen), Mischung des Bakterienmaterials mit einem Tröpfchen Fingerblutes. Genaue Messung mit Mikrometermasstäben im Okular u. s. w.

2. Schnittpräparate.

Härten von Gewebsstücken: Man härtet kleine, allerhöchstens fingergliedgrosse Organstücke mindestens drei Tage in mehrfach erneuertem absoluten Alkohol. (Auf den Boden des zur Härtung dienenden Gefässes bringt man einen Bausch Fliesspapier; liegen die zu härtenden Gewebsstücke darauf, so befinden sie sich stets in den höheren wasserärmeren Schichten des Alkohols. So können sie jahrelang konserviert werden, doch leidet die Färbbarkeit mancher Bakterien allmählich.) Vor der Alkoholhärtung kann man die Stücke auch behufs guter Fixierung 12—24 Stunden in Formalin einlegen. — Schnellmethoden s. S. 83.

Zum Schneiden braucht man ein Mikrotom und sucht sehr dünne Schnitte zu erreichen. Man bereitet die gehärteten Gewebsstücke dazu durch Aufkleben oder Einbetten vor, wozu sich folgende Methoden empfehlen (1 u. 2 nur für festere und parenchymatöse Gewebe, 3 u. 4 namentlich für hohlraumreiche Gewebe und kleine Gewebsstücke.)

1. Aufkleben mit Glyzeringelatine: Solve Gelatine 10 in Glyzerin 40 + Aq. 20 durch Erhitzen. Ein Tropfen davon wird auf ein Korkstück gebracht, das zu schneidende Stück darauf gedrückt und das Ganze nach ein paar Minuten in absoluten Alkohol geworfen. Nach einigen Stunden ist die Glyzeringelatine erstarrt und das Stück schnittfähig. Die Schnitte werden in einem Schälchen mit 50 %-

igem Alkohol aufgefangen; das Messer damit beim Schneiden befeuchten.

2. **Einbettung in Celloidin:** Die in Alkohol gehärteten Stücke kommen 1—8 Tage in dünnflüssiges, in Alkohol und Äther $\overline{aa}$ gelöstes Celloidin, darauf eben so lange in dickflüssiges, dann werden sie mittelst eines Spatels samt dem anhaftenden Celloidin auf Kork- oder Holzwürfelchen übertragen, dabei nicht zu fest andrücken! Wenn das Celloidin nach einiger Zeit an der Luft leicht getrocknet ist, kommen die Stücke in 50—60%igen Alkohol (nicht absoluten!), um das Celloidin fest werden zu lassen und sind dann nach etwa 24 Stunden schnittfähig. Die Schnitte werden in einem Schälchen mit 50%igem Alkohol aufgefangen; das Messer damit beim Schneiden befeuchten.

3. **Einbettung in Paraffin:** Die gehärteten Stücke werden für einige Stunden bis Tage (bis sie transparent werden) in Xylol gebracht, dann eben so lange in eine Lösung von Paraffin in Xylol, dann in verflüssigtes, ca. 50° warmes Paraffin (durch Mischen verschiedener Sorten stellt man sich Paraffin von diesem Schmelzpunkt her); hierin bleiben sie (im ca. 50° warmen Paraffinofen, reguliert wie Brutapparat) 1—2 Stunden. Das alsdann mit Paraffin vollgesaugte Organstück nimmt man mit einem Spatel heraus, legt es auf eine reine Glasplatte, stellt einen viereckigen, ca. 2 cm hohen Rahmen aus Glas, Metall oder Pappe so um das Präparat, das es in der Mitte liegt, und giesst nun das heisse Paraffin in den Rahmen; zur schnellen Erstarrung des Paraffins kann man die Glasplatte in kaltes Wasser tauchen. Die Paraffinblöckchen werden, wenn sie nicht gleich geschnitten werden, mit Etiketten (anstecken mit Nadel) bezeichnet. Vor dem Schneiden entfernt man mit dem Messer das Paraffin bis in die Nähe des eingebetteten Objektes. Schneiden mit *trockenem* Mikrotommesser. Die Schnitte in eine Schale mit Wasser von 40—45° bringen. Hier breiten sich die Schnitte an der Oberfläche sofort glatt aus. Man fängt sie dann aus dem Wasser mit einem sauberen Objektträger von unten her so auf, dass sie glatt auf dem Glase liegen, stellt den Objektträger schräg, damit das Wasser abläuft, trocknet vollständig durch Einstellen in den 37°-Brutapparat und bringt dann den Objektträger mit dem Schnitt in den Paraffinofen, bis das Paraffin eben schmilzt und abzulaufen beginnt. Alsdann entfernt man

es durch Spülen mit Xylol, danach das Xylol mit Alkohol absol. Der Schnitt haftet fest am Objektträger.

4. **Einfrieren in Anisöl:** Die Gewebsstücke werden durch Abtupfen mit Fliesspapier vom Alkohol möglichst befreit und wenigstens 24 Std. in Anisöl eingelegt. (Anisöl in 37°-Brutschrank verflüssigt, mit den Orangstücken in gut schliessende Glasbüchsen gegeben und im 37°-Brutschrank gehalten.) Dann werden sie mit einigen Tropfen des Öles auf das Gefriermikrotom übertragen; das Öl wird mit Äthergebläse zum Gefrieren gebracht und das Objekt nun geschnitten. Die Schnitte fängt man in 37° warmem Anisöl auf und befreit sie nach dem Auftauen durch Absaugen des Öles und Einlegen in wiederholt erneuerten Alkohol absol. vor der Färbung vom Öl. — Ähnlich lässt sich Kakaobutter verwenden.

Schnellhärtung und -einbettung:

a) nach Lubarsch (D. m. W. 03 Nr. 48). Die Gewebsstücke (möglichst frisch), 1—5 mm dick kommen in der Wärme (Paraffinofen von 50—60°) 1. in 10%iges Formalin 10—15 Min. 2. in 95%igen Alkohol (einmal wechseln!) 5—10 Min. 3. in absol. Alkohol (einmal wechseln!) 10 Min. 4. in klares Anilinöl, bis sie völlig durchsichtig sind (10 bis 30 Min.) 5. in Xylol (zwei- bis dreimal wechseln, bis es nicht mehr gelb wird) 15—20 Min. 6. in Paraffin 10—60 Min. Dauer des Verfahrens 1½—3 Stdn.

b) nach Henke-Zeller (Ctrlbl. f. path. Anat. 05 Nr. 1). Die 1—3 mm dicken Gewebsstücke bei 37° für 30—40 Min. in wasserfreies Aceton, ebenso lange in Paraffin. Dauer des Verfahrens 1—1½ Stdn.

c) nach Scholz (D. m. W. 05 Nr. 11). Die Gewebsstücke, 3—5 mm dick, im 37° Brutofen 30—60 Min. in reines Aceton. Dann Ausschütteln in Äther + Alkohol absol. aa, Einlegen in dünnes Celloidin (ebenfalls im Brutofen). Nach 4—5 Stdn. in dickes Celloidin, mit diesem nach 2—3 Stdn. Ausgiessen in flachen Schälchen. Schnelltrocknung unter der Glasglocke durch Verdampfen von Chloroform. Schnittfähig nach 12—14 Stdn.

Zum **Färben** kommen die Schnitte aus dem Alkohol bei der einfachen Färbung zunächst — und zwar stets nur 1—3 auf einmal — in ein Schälchen (besser viereckige Salznäpfchen), sog. Farbblocks, als die leicht kippenden Uhrschälchen) mit stets frisch filtrierter Farblösung. (Einstellung in den 37°-Brutapparat beschleunigt die Färbung meist!) Dann werden sie

„differenziert" zwecks distinkter Färbung der zunächst diffus gefärbten Gewebselemente; dazu dienen verdünnte Säuren, verdünnter oder saurer Alkohol (s. besondere Vorschriften bei den einzelnen Färbemethoden). Die vorher intensiv gefärbten Schnitte bekommen hier eine hellere Farbe. Darauf folgt Entwässern in Alkohol. absol. (zur Vorbereitung der späteren Aufhellung der Schnitte). Die Schnitte werden hierbei schnell hart und unbiegsam, müssen also sogleich im Alkohol möglichst glatt ausgebreitet werden; man halte sie in den oberen Schichten des Alkohols, weil diese wasserärmer bleiben. Nunmehr kommen sie zur Aufhellung in Zedernöl (nicht das Immersionsöl, sondern gewöhnliches, nicht eingedicktes Zedernöl) oder in Bergamott-, Origanum-, Nelkenöl (zieht oft die Farbe stark aus!) oder in Xylol (trübt sich schon durch Spuren von Wasser!). Alsdann wird der Schnitt auf den Objektträger übertragen und kann im Öl mit einem Deckgläschen bedeckt untersucht werden. Will man ihn aufbewahren, so tupft man das Öl ab, spült mit Xylol ab und bringt einen Tropfen in Xylol gelösten Kanadabalsams auf den Schnitt, dann ein Deckglas darauf. In Xylol aufgehellte Schnitte werden nicht im Xylol, da dieses schnell verdunstet, sondern in Kanadabalsam untersucht. Der Balsam wird in wenigen Tagen hart. Entfernung überschüssigen Balsams s. S. 35 Mitte. — Auf dem Objektträger aufgetrocknete Schnitte (vergl. S. 37 unter 3) werden analog behandelt, nur werden die Lösungen auf die Schnitte gebracht oder die ganzen Objektträger in die Lösungen eingetaucht. Auch Schnitte nicht in Paraffin eingebetteter Organe kann man auf dem Objektträger antrocknen und färben. Näheres s. bei den einzelnen Färbemethoden.

Untersuchung stets zunächst mit schwacher Vergrösserung zur Orientierung über Färbung des Schnittes und gröbere pathologische Veränderungen des Gewebes.

Zum Manipulieren der Schnitte verwendet man durch Ausziehen von Glasstäben gefertigte Glasnadeln mit rund geschmolzenem Ende (nicht Metallnadeln, da diese durch manche bei der Färbung gebrauchte Stoffe angegriffen werden). Spatel braucht man am besten nur beim Übertragen eines Schnittes auf den Objektträger; man kann aber auch den Schnitt unmittelbar mit dem Objektträger von unten auffangen.

Farbstoffe zur Bakterienfärbung.

Zur Färbung der Bakterien dienen hauptsächlich folgende basischen Anilinfarben: Gentianaviolett, Methylviolett,

Dahlia, Methylenblau, Fuchsin und (das sehr ähnlich zusammengesetzte) Rubin, Bismarckbraun (Vesuvin). Sie tingieren ausser Bakterien Zellkerne intensiv und dauernd, die übrigen Gewebselemente in geringerem Grade. Methylenblaulösungen vertragen starkes Erhitzen nicht, die anderen Farbstoffe gut.

Zur Färbung der Gewebselemente in Kontrastfarbe zu den Bakterien dienen (ausser basischen) saure Anilinfarben) z. B. Eosin), die aber die Kerne wenig gut tingieren, — von anderen Farbstoffen Karmin. (Manche Mikroorganismen färben sich auch mit diesen Farbstoffen, so z. B. Staphylococcus pyogenes.) Man verwende nur Farbstoffe von bekannten Fabriken, um sich Fehlschläge zu ersparen, und achte auf die nähere Bezeichnung des Farbstoffs!

Herstellung der einfachsten Farblösungen zum Färben.

1. Wässerig alkoholische Lösungen:

Man hält sich Stammlösungen der Farbstoffe vorrätig, d. h. bei Zimmertemperatur gesättigte Lösungen in absolutem Alkohol. (In einer Flasche mit Glasstopfen soviel Farbstoff mit Alkohol absol. übergossen, dass ein Teil ungelöst bleibt.) Zum Färben sind die Stammlösungen schlecht geeignet. Man stellt aus ihnen Farblösungen her, indem man soviel von ihnen in destilliertes Wasser filtriert, bis die Lösung in Reagenzglasdicke eben anfängt undurchsichtig zu werden. Am besten immer frisch herzustellen!

2. Wässerige Lösungen:

Man schüttet Farbstoff im Überschuss in destilliertes Wasser, schüttelt tüchtig um und filtriert nach einigen Stunden ab. Am besten immer frisch herzustellen!

Allgemein merke man, dass man stets besser gefärbte Präparate bekommt, wenn man mit dünnen Farblösungen, aber lange färbt, als wenn man mit starken Lösungen kurze Zeit färbt.

Verstärkte Anilinfarblösungen.

Intensiver färbend als die einfachen Farblösungen.

a) Loefflersche Methylenblaulösung.

30 ccm gesättigte alkohol. Methylenblaulösung,
100 ccm 0,01 %iger Kalilauge (= 1 ccm 1 %ige Kalilauge auf 100 Wasser). Haltbar.

b) Anilinwasser-Farblösungen. Man gibt in ein Reagenzglas soviel (recht helles) Anilinöl, dass seine Kuppe damit gefülft ist, giesst das Röhrchen $^{3}/_{4}$ voll Wasser und schüttelt kräftig durch. Nach dem Durchschütteln muss noch ungelöstes Anilinöl übrig sein. Das durch ein angefeuchtetes Filter durchlaufende Filtrat muss wasserklar und öltropfenfrei sein (das Öl nicht mit auf das Filter giessen, nicht alle aufgegossene Flüssigkeit filtrieren! ev. nochmals filtrieren). Man setzt zu ihm soviel gesättigte alkohol. Gentianaviolett-, Methylviolett- oder Fuchsinlösung, dass die Farbflüssigkeit in reagenzglasstarker Schicht eben noch durchsichtig ist oder bis ein schillerndes Häutchen an der Oberfläche entsteht. Oder man löst soviel des festen Farbstoffes im Anilinwasser, als sich lösen will. Die Färbkraft der Lösungen kann man durch Zusatz von 1 ccm 1 %iger NaOH auf 100 ccm Lösung erhöhen. Die Lösungen sind wenig haltbar, ebenso das Anilinwasser an sich.

c) Karbolfuchsin nach Ziehl-Neelsen:
100 ccm 5 %ige Karbolsäure,
10 ccm gesättigte alkohol. Fuchsinlösung.
Färbt in etwa 3—4 facher Verdünnung langsamer, aber reiner, ohne leicht zu überfärben. Sehr haltbar.

d) Karbolglyzerinfuchsin nach Czaplewski.
1 g Fuchsin mit 5 ccm Acid. carbol. liquefact. verreiben, 50 ccm Glyzerin, dann 100 ccm Aq. dest. zusetzen. Auf das 4—10 fache verdünnt zur Färbung brauchbar. Haltbar.

e) Karbolmethylenblau nach Kühne:
1,5 g Methylenblau,
10 ccm Alkohol absolutus,
100 ccm 5 %ige Karbolsäure. Gut haltbar.

Einfache Färbung von Ausstrichen

führt man hauptsächlich mit Methylenblau-, Fuchsin-, Gentianaviolettlösungen, wie auf S. 34 u. 38 beschrieben, aus.

Die Wahl des Farbstoffes richtet sich nach der Vorliebe des Untersuchers für die eine oder andere Farbe. Manche Bakterien färben sich jedoch besser mit einer bestimmten Farbe als mit den andern (vgl. Diphtheriebazillen S. 62, Choleravibrionen S. 82). Blut, Eiter, Gewebsausstriche färben sich im allgemeinen am reinsten mit Methylenblau; so gefärbte aufzubewahrende Präparate lege man in Immersionszedernöl, nicht Kanadabalsam ein (s. S. 35).

Einfache Färbung von Schnitten.

a) Nach Loeffler:

1. Färben in alkalischer Methylenblaulösung (Anilinwasser- oder Karbolfuchsinlösung) 5—30 Min.
2. Differenzieren in $^1/_2$—1 %iger Essigsäure bis zum Distinktwerden des Gewebes (einige Sek. bis $^1/_2$ Minute je nach der Schnittdicke und Färbungsintensität).
3. Entwässern in absolutem Alkohol (wenn gefärbt, zu wechseln).
4. Aufhellen in Zedernöl etc. Bazillen und Gewebe blau (oder rot).

b) Nach R. Pfeiffer:

1. Färben in verdünntem Karbolfuchsin (Ziehlsche Lösung 1 + Aq. dest. 3) 15—30 Minuten.
2. Übertragen in Alkohol absol. + 1—2 Tropfen Essigsäure pro Schälchen. Sobald die Schnitte anfangen rotviolett zu werden.
3. Übertragen in Zedernöl oder Xylol etc.

c) Mit Gentianaviolett:

1. Färben mit wässeriger Lösung 15—30 Min.
2. Auswaschen erst in 50 %igem Alkohol, dann in absolutem Alkohol, bis die Schnitte eine hellviolette Farbe haben.
3. Aufhellen in Zedernöl etc.

d) Nach Kühne-Pregl:

1. Färben in Karbolmethylenblau $^1/_2$—1 Min.
2. Kurzes Abspülen in Wasser.
3. Entfärben in 50 %igem Alkohol, bis die Schnitte blassblau (mit einem Stich ins Grünliche) geworden sind.
4. Entwässern in absolutem Alkohol.
5. Aufhellen in Zedernöl etc.

e) Nach Nicolles Methylenblau-Tanninmethode:

1. Färben mit alkal. Methylenblau oder Karbolmethylenblau wie bei a und d.
2. Spülen in Wasser oder $^1/_2$—1 %iger Essigsäure einige Sekunden.
3. Übertragen in 10 %ige Tanninlösung (wodurch das Methylenblau unlöslich wird) für einige Sekunden. Auch 1 %ige Tanninlösung genügt bereits.)
4. Abspülen in Wasser, Entwässern in Alkohol, Aufhellen in Öl etc.

Für leicht sich entfärbende Bazillen (Typhus, Rotz etc.) empfehlenswert.

f) Nach Nicolles Thioninmethode:
1. Färben in Thioninlösung 1/2—1 Min. (Gesätt. Lösung von Thionin in 50%igem Alkohol, davon 10,0 + 1%igen Karbolwassers 100,0).
2. Abspülen in Wasser.
3. Entwässern in Alkohol absol., dann Öl etc.

Wie Methode e für leicht sich entfärbende Bakterien empfehlenswert.

Die Methoden a, b und f sind wegen ihrer Einfachheit und ihrer guten Resultate vorzuziehen.

Isolierte, resp. Kontrast-Färbung der Bakterien.

I. Nach Pick-Jacobsohn. Für Ausstriche. Färben höchstens 8—10 Sek. mit einer Mischung von Karbolfuchsin Ziehl (S. 41 c.) 15 Tropfen, gesätt. alkohol. Methylenblaulösung 8 Tropfen, Aq. dest. 20,0. Bakt. dunkelblau, Kerne hellblau, übriges Gewebe rot. (Altgewordene Farblösung durch Zusatz von etwas Karbolfuchsin aufbessern!)

II. Methylenblau-Eosinfärbung. Für Ausstriche.
1. Färben 1/2 Min. mit einer frischen Mischung von Löfflerscher Methylenblaulösung. (S. 40) 30,0 mit gesättigter alkohol. Eosinlösung ca. 10,0. (Ausproben!)
2. Abspülen in Wasser.

Bakterien und Kerne blau, Zellprotoplasma usw. rot.

III. Nach May-Grünwald. (Ztrlbl. f. inn. Med. 02 Nr 11.)
Je 1000 ccm 1‰iger wässer. Lösung von Eosin und Methylenblau medicinale Höchst werden gemischt und nach einigen Tagen filtriert. Der Rückstand wird mit Wasser gewaschen, bis dieses fast farblos abläuft. Dann wird vom getrockneten Rückstand eine gesätt. Lösung in Methylalkohol hergestellt und (ohne Fixierung der Deckglasausstriche) zum Färben kalt benutzt (einige Min. bis Stdn.) Danach Abspülen in Wasser + einigen Tropfen der Lösung. Farbsoff zu bebeziehen bei Dr. Schwalm, München, Sonnenstr. 10. Besonders für Blut- und Eiterpräparate. — Assmann, M. M. W. 1906 Nr. 28, übergiesst Ausstriche in Petrischale mit 40 Tr. der Lösung für 3 Min., setzt dann 20 ccm Aq. dest. + 5 Tr. 1‰ K_2CO_3 hinzu, schüttelt und lässt 5 Min. färben. Dann ohne Abspülen trocknen usw.

IV. **Gramsche Färbung.** (Sowohl zur deutlichen Darstellung von Bakterien, wie auch als diagnostisches Mittel, da

sich nur bestimmte Bakterienarten nach ihr darstellen lassen, — s. S. 45 — vorzüglich.)

a) Ausstriche:

1. Färbung mit Anilinwasser-Gentianaviolettlösung oder Anilinwasser-Methylviolettlösung (s. S. 41) unter Erwärmen mindestens 2 Minuten lang. Geeignetste Farbstoffe sind Methylviolett Höchst 6B und BN.

(1a Abspülen in Anilinwasser (kann fortbleiben).

2. 30 Sekunden bis 2 Minuten in Jodjodkaliumlösung. (Solve Jodi 1,0, Kal. jodat. 2,0 in Aq. destill. 5,0; nach Lösung adde Aq. destill. 295,0.) Hierbei entsteht in den Leibern bestimmter Bakterienarten (s. S. 45 welcher) eine Farbstoffjodverbindung, die in Alkohol unlöslich ist.

3. Entfärben des Präparates in Alkohol absol., bis es dem Auge farblos erscheint. Jetzt sind die nach Gram färbbaren Bakterien isoliert schwarzblau gefärbt, alle anderen Bakterien und die Gewebselemente (bis auf einzelne Zellkerne) farblos. Man kann die Deckgläser nun in Wasser (oder nach Trocknen in Balsam) untersuchen oder

4. Nachfärben mit wässerig-alkohol. Vesuvin-, auch Safranin- oder Fuchsinlösung einige Sek. oder mit Pikrokarmin (s. S. 47) 2—10 Min. Die Nachfärbung mit Vesuvin- oder Fuchsinlösung hat den Vorteil, dass durch sie im Präparate etwa vorhandene, nicht das Violett festhaltende Bakterien deutlicher gefärbt werden, als mit Safranin- oder gar Karmin.

5. Abspülen in Wasser.
Gramfärbbare Bakterien schwarzblau. Gewebe rot.

b) Schnitte (vgl. hierzu die Bemerkungen unter a):

1. Färbung in Anilinwasser-Gentianaviolett oder -Methylviolettlösung 5—30 Min.

1a) Abspülen in Anilinwasser 30 Sek. (Kann fortbleiben.)

2. Übertragen des Präparates 1—2 Min. in Jodjodkaliumlösung. Die Schnitte werden hier braunschwarz.

3. Auswaschen in Alkohol absolutus bis der Schnitt ganz oder ziemlich farblos erscheint. Jetzt sind die nach Gram tingierbaren Bakterien isoliert schwarzblau gefärbt. Man kann nun in Zedernöl aufhellen etc. oder eine Gegenfärbung des Gewebes und etwa vorhandener, nach Gram nicht färbbarer Bakt. anwenden (4—7).

4. Nachfärbung mit Pikrokarmin- (s. S. 47), Safranin- oder dünner Fuchsinlösung 5—10 Min. (nach vorhergehender Abspülung in Wasser oder verdünntem Alkohol).
5. Abspülen in 60 % Alkohol.
6. Entwässern in absolutem Alkohol.
7. Aufhellen in Zedernöl u. s. w.

Man kann auch 4—5 vorausschicken und darauf 1—3 und 7 folgen lassen.

Gramfärbbare Bakterien schwarzblau, Gewebe rot (Zellkerne oft blassblau bis dunkelblau). Bakterien meist nicht an allen Stellen des Präparates gleichmässig gut gefärbt.

Modifikationen der Gramschen Methode.

α) Statt Anilinwasser-Farblösung kann man auch mit 1—2½ %igem Karbolwasser hergestellte benutzen, die länger haltbar ist. Nach der Färbung kann Abspülen in entsprechendem Karbolwasser folgen. Auch Zusatz von 1 Zehntel gesätt. alkohol. Methylenblaulösung zur Farblösung wird empfohlen.

β) Zur Beschleunigung der Entfärbung können dienen statt des Alkohols nach Günther Alkohol absol. + 3 % HCl für 10 Sek., dann Alkohol absol., nach Nicolle Alkohol absol. + 20—30 Volumproz. Aceton. (Nicolle empfiehlt Karbolwassergentianaviolett mit 1 %igem Karbolwasser, Jodjodkaliumlösung 1 K + 2 KJ + 200 Aq.)

Nach der Gramschen Methode lassen sich färben, d. h. bleiben bei der Alkoholbehandlung (3) schwarzblau gefärbt: Milzbrandbazillen, Tetanusbazillen, Tuberkel- und Leprabazillen (für diese hat die Färbung nur dann Zweck, wenn man sicher ist, ausser ihnen keine anderen Bakterien im Präparat zu haben), Diphteriebaz., Schweinerotlaufbaz., Mäuseseptikämiebaz., die pyogenen Streptokokken und Staphylokokken, die Fraenkelschen Pneumokokken, Micrococcus tetragenus, Streptothrix Actinomyces, Hefen, Kartoffelbaz. u. a. m. (NB. Allzulange fortgesetzte Alkoholbehandlung entfärbt auch manche dieser Bakterien, insbesondere in älteren Kulturen!)

Die Gramsche Methode ist nicht anwendbar, weil die betreffenden Bakterien sich im Alkohol entfärben, zur Darstellung von Typhusbaz., Bacterium coli und ähnlichen, Ruhrbaz., Cholera- und choleraähnlichen Vibrionen, Hühnercholera- und Kaninchenseptikämiebaz., Baz. des malignen Ödems und Rauschbrandes (bleiben ab und zu gefärbt, s. auch S. 46

Nr. VI), Friedländers Pneumoniebaz., Baz. Pyocyaneus, Baz. der Bubonenpest, Rotzbaz., Influenzabaz., Koch-Weeksschen Baz., Ulcus molle-Baz., Rekurrens- und Syphilisspirochaeten, Gonokokken, Meningokokken.

Zur Prüfung einer Bakterienkultur auf ihr Verhalten bei der Gramschen Färbung benutze man stets junge Kulturen und bringe zur Prüfung, ob man exakt gearbeitet hat, bei Kokken von einer jungen Milzbrandbaz.-, bei Baz. von einer jungen Staph. pyog. aur.-Kultur etwas Material an einer Stelle des Deckglases oder Objektträgers mit zum Ausstrich: bei richtiger Ausführung der Färbemethode sind die Milzbrandbaz. und die Staph. schwarzblau gefärbt. Nicht zu kurze Alkoholbehandlung, weil sonst alle Bakt. nach Gram darstellbar sind! (Ev. Kontrollfärbung der zu prüfenden Bakt.-art mit Typhusbaz. oder Choleravibrionen zusammen, die sich nach Gram nicht färben!)

V. Weigerts Färbung für Schnitte (sog. Fibrinmethode).

1. Färben mit Lithionkarmin (Karmin 2,5—5,0 gelöst in gesättigter wässer. Lösung von Lithium carbon. 100,0) oder wässer. alkohol- Safraninlösung $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde (auch in Karbolfuchsin Ziehl 1 + 4 Aq. dest.).
2. Abspülen in 50%iger Kochsalzlösung.
3. Färben in Anilinwassergentianaviolett 5—30 Minuten. — Oder nach Kühne in folgender Lösung: Kristallviolett 1 gelöst in Alkohol absol. 10; davon 1 auf 10 Aq. dest. + 2 Tropfen Salzsäure.
4. Abspülen in 0,6%iger Kochsalzlösung.
5. Übertragen des Schnittes auf den Objektträger und Abtrocknen desselben mit Fliesspapier.
6. Aufbringen von Jodjodkaliumlösung 1—2 Minuten lang.
7. Abtrocknen mit Fliesspapier.
8. Entfärben mit Anilinöl, bis dieses sich nicht mehr färbt. Man kontrolliert mit Hilfe des Mikroskopes die Färbung des Schnittes!
9. Entfärben des Anilinöls mit Xylol, Einlegen.

Bakterien violettblau, Fibrin tiefblau, Gewebe rot. Pikrokarmin ist zur Gewebsvorfärbung nicht besonders geeignet, weil das Anilinöl die Pikrinsäure aus dem Gewebe auszieht.

VI. Nach Claudius: Der Gramschen Färbung gleichwertig (die Pikrinsäure wirkt wie Jodjodkalium), gibt weniger Nieder-

schläge als diese, stellt auch die Baz. des malignen Ödems und des Rauschbrandes schwarzblau dar.

a) für Ausstriche.

1. Färben in 1 %iger wässer. Methylviolettlösung 1 Min., dann Abspülen mit Wasser, Trocknen mit Fliesspapier.
2. Abspülen in gesättigter wässer. Pikrinsäurelösung + Aq. dest. $\overline{aa}$.
3. Abspülen in Wasser, Trocknen mit Fliesspapier.
4. Abspülen in Chloroform oder Nelkenöl, bis das Präparat ungefärbt erscheint.
5. Abtrocknen mit Fliesspapier, Einlegen in Balsam.

b) Für Schnitte (auf dem Objektträger vorzunehmen).

1. Färben wie bei a) 2 Min. und länger.
2. Abspülen in Wasser, Trocknen mit Fliesspapier.
3. Pikrinsäure wie bei a) 2. 2 Min.
4. Abwaschen in Aq., sorgfältig trocknen mit Fliesspapier.
5. Behandeln mit Nelkenöl bis der Schnitt farblos erscheint, Xylol, Einlegen.

Bakterien blau. Gewebe farblos bis gelblich, kann aber durch Vorfärbung mit Karminlösungen (wie bei Gramscher Färbung s. S. 45 oben) rot tingiert werden.

Pikrokarminlösung zur Kontrastfärbung der Gewebe.

a) Nach Friedländer bereitet: Solve Karmin 1,0 in Aq. dest. 50,0 + Ammoniak 1,0. Adde gesättigte wässer. Pikrinsäurelösung so lange, bis der sich bildende Niederschlag beim Umrühren nicht mehr gelöst wird. Etwas Ammoniakzusatz löst den Niederschlag wieder. Zur Verhinderung von Mikroorganismenwachstum in der Lösung setzt man einige Tropfen Karbolsäure zu. Vor dem Gebrauch zu filtrieren. Haltbare Lösung.

b) Nach Weigert hergestellt: Karmin 2 + Ammoniak 4 steht 24 Stunden. Dann 200 g konzentrierte wässerige Pikrinsäurelösung hinzufügen, nach 24 Stunden Essigsäure tropfenweise, bis Niederschlag erfolgt, hinzu, dann Ammoniak tropfenweise, bis die Lösung klar ist.

Kapselfärbung.

Viele Bakterienkapseln lassen sich in Deckglaspräparaten durch längeres Erwärmen mit Loefflerscher oder Ziehlscher Lösung (S. 40a und 41c) blass blau-violett oder rot färben.

Von besonderen Methoden sind zu erwähnen: Färbungen:

a) Nach Weidenreich-Hamm, C. B. I. Or. 43 S. 287: Ausstreichen des Präparates in einem Tröpfen Serum. Fixierung mit Osmiumsäure (S. 34), nicht mehr als 30—40 Sek. Dann Färbung mit Giemsascher Lösung (S. 97).

b) Nach Johne:
   1. Färbung mit 2%iger wässer. Gentianaviolettlösung unter Erwärmen 1—2 Min.
   2. Abspülen in Wasser.
   3. Entfärben in 1—2%iger Essigsäure 6—10 Sek.
   4. Abspülen in Wasser und Untersuchen darin. Kanadabalsam lässt die Kapseln verschwinden!

c) Nach Ribbert.
   1. Färben des Deckgläschens für einige Sekunden mit folgender Lösung: Aq. dest. 100,0, Alkohol absol. 50,0, Acid. acet. glac. 12,5 + Dahlia soviel sich in der Wärme löst.
   2. Abspülen in Wasser, Untersuchen darin oder Trocknen, Balsam (letzterer macht die Kapseln undeutlicher!).

d) Nach Nicolle. (Für Ausstriche und Schnitte.)
   1. Färben mit folgender Mischung: Gesätt. Lösung von Gentianaviolett in 95%igem Alkohol 10,0, 1%iges Karbolwasser 100,0.
   2. Abspülen in Alkohol. absol. + 1/3 Volumen Aceton. Abspülen im Wasser für Deckgläschen; Alkohol absol., Öl etc. für Schnitte.

e) Bunges Geisselfärbmethode (s. S. 51 oben).

f) S. ferner Methoden f. Milzbrandbaz. S. 53, die auch für manche anderen Bakt. brauchbar sind.

Sporenfärbung.

a) 1. Färben der Deckglaspräparate unter starkem Erhitzen mit Anilinwasser- oder Karbolfuchsin (1 Stunde mit der bestrichenen Seite nach unten auf der Farblösung schwimmend oder 10 Minuten mit der Farblösung — stets Auffüllen der Lösung, wenn sie verdampft! — auf dem Deckglase).

   Das Eindringen der Farblösung in die Sporen erreicht man besser nach 30—40 maligem Durchziehen der Präparate durch die Flamme bei der Fixierung (s. S. 34).

   2. Auswachsen mit Alkohol + 3% Salzsäure (oder 1% Schwefelsäure oder 3% Salpetersäure) 1/2—1 Minute.
   3. Nachfärben mit wässer.-alkohol. Methylenblaulösung.

4. Abspülen in Wasser, Untersuchen darin oder Trocknen, Balsam. Sporen rot, Bazillen blau.

Vorzuziehen, weil zuverlässiger, ist die Methode

b) von Möller.

1. Behandlung der Deckgläschen (nach dem Fixieren) 5 Sekunden bis 10 Min. mit 5 %iger Chromsäure. Die Zeitdauer ist für jede Organismenart auszuprobieren.
2. Abspülen in Wasser.
3. Färben mit Anilinwasserfuchsin oder Karbolfuchsin 1 Minute unter Aufkochen.
4. Entfärben in 5 %iger Schwefelsäure 5 Sekunden.
5. Abspülen in Wasser.
6. Nachfärben mit Methylenblaulösung, Abspülen usw.

Vor der Chromsäurebehandlung kann man die Präparate 2 Minuten in Chloroform bringen, um Sporen vortäuschende Fetttröpfchen etc. zu entfernen. Danach Abspülen in Wasser.

Nach Aujeszky (C. B. I, Bd. 23 S. 329) bringt man die lufttrockenen, nicht fixierten Ausstriche 3—4 Min. in heisse ½ %ige HCl, spült in Wasser ab, trocknet, fixiert und färbt dann wie vor 3—6. Nach Orszag (C. B. I. Or. 41 S. 397) streicht man das Bakterienmaterial in einem Tropfen einer Mischung von 4 Teilen ½ %iger Natr. salicyl.-Lösung und 1 Teil 5 %iger Essigsäure aus, lässt lufttrocken werden, fixiert in der Flamme und behandelt dann wie bei b) 3—6 (bei 4. 1 %ige H_2SO_4 oder 3 %ige HNO_3).

Geisselfärbung.

Man nehme Bakterienmaterial von festen, nicht flüssigen Kulturmedien, — besonders gut sind junge Agarkulturen — nachdem man sich durch Untersuchung im hängenden Tropfen von der Beweglichkeit überzeugt hat. Die zu beizenden Bakterien sollen möglichst isoliert liegen und wenig Nährbodenbestandteile beigemischt enthalten, was man auf folgende Weise erreicht: Auf sechs sehr sorgfältig gereinigte Deckgläschen bringt man je ein Tröpfchen Wasser, überträgt etwas Bakterienmaterial in das erste, von diesem eine Spur in das zweite, von diesem in das dritte und so fort. Oder: Man bringt etwas Bakterienmaterial in ein Tröpfchen Wasser auf einem Objektträger und überträgt davon eine Spur in einen grösseren Wassertropfen, dem 1—2 Ösen 2 %iger Osmiumsäurelösung zugesetzt sind; von diesem Tropfen stellt man Deckglasausstriche her. Oder: Man stellt im Reagenzglase mit 0,8 %iger

NaCl-Lösung eine dünne Bakterienaufschwemmung her, bringt Tröpfchen davon auf Deckgläschen, streicht sie ohne zu viel zu reiben aus, lässt lufttrocken werden und fixiert mittelst Durchziehens durch die Flamme.

Die Deckgläschen müssen ganz sauber sein! (Reinigung s. S. 5.)

A. Geisselfärbung nach Loeffler:

1. Beizen der Geisseln mit der unten angegebenen Beize. Erwärmen derselben auf dem Deckglas bis zur Dampfbildung ½—1 Minute.
2. Abspülen der Präparate mit einem kräftigen Wasserstrahle. Sorgfältiges Entfernen der Beize an den Rändern (ev. mit Fliesspapier) und auf der Fläche.
3. Abspülen in Alkohol, bis nur die Stellen, an welchen Organismen liegen, gebeizt (gefärbt) erscheinen.
4. Färben mit Anilinwasserfuchsinlösung (zu der nach S. 41 b bereiteten Lösung zweckmässig Zusatz von 1 % einer 1 %igen NaOH oder noch mehr, bis zum Eintritt der Schwebfällung, d. h. zum eben beginnenden Trübwerden der Lösung — jedesmal frisch bereiten!) unter Erwärmen.
5. Abspülen in Wasser.

Als Beize dient eine Mischung von 10 ccm 20 %iger Tanninlösung, 5 ccm kalt gesättigter wässer. Lösung von Ferrosulfat oder Ferr. sulfur. oxydul. ammon., 1 ccm wässeriger oder alkoholischer Fuchsin- (auch Methylviolett- oder Wollschwarz-) lösung. Diese Beize ist nach Loeffler für die Färbung der Geisseln Spirillum concentricum gerade richtig; für die Typhusbazillen des ist ein Zusatz von 1 ccm 1 %iger Natronlauge auf die 16 ccm Beize nötig, für Bacillus subtilis 28—30 Tropfen, für den Bacillus des malignen Ödems 36—37 Tropfen der Lauge. Um die Geisseln der Choleraspirillen resp. die des Spirillnm rubrum zu beizen, muss man ½—1 resp. 9 Tropfen einer auf die 1 %ige Natronlauge eingestellten Schwefelsäure zu den 16 ccm Beize zusetzen.

Nach Nicolle und Morax kann man von den Laugen- und Säurezusätzen absehen, wenn man 3—4 mal je 10 Sek. unter Erwärmen bis zur Dampfbildung (nicht zum Kochen) beizt und zwischen je zwei Beizungen sorgfältig mit Wasser abspült. Statt wie sub 3 in Alkohol kann man in Wasser abspülen.

Niederschläge im Präparat vermeidet man durch sehr sorgfältiges Spülen. Zweckmässig ist es auch, beim Beizen und Färben erst ein Stückchen Fliesspapier auf das Präparat und darauf die Lösung zu bringen.

Modifikation von Bunge:

1. Beizen mit folgender Lösung: 3 Teile konzentr. wässer. Tanninlösung, 1 Teil Liquor ferri sesquichlor. 1:20 Aq. Zu 10 ccm der Mischung 1 ccm gesättigter wässer. Fuchsinlösung. Die Beize soll mindestens einige Tage stehen. Vor Gebrauch wird ihr tropfenweise Wasserstoffsuperoxyd zugesetzt, bis ihre Farbe rotbraun wird (ca. 14 Tropfen 3 %ige H_2O_2-Lösung auf 5 ccm Beize). Dann wird die Lösung auf das zu beizende Deckgläschen filtriert und soll eine bis fünf Minuten (unter Erwärmen) einwirken. (Die Beize mit dem H_2O_2-Zusatz hält sich nur ganz kurze Zeit brauchbar.)
2. Abspülen in Wasser.
3. Trocknen zwischen Fliesspapier.
4. Färben mit Karbolgentianaviolettlösung (s. S. 45 a) unter leichtem Erwärmen.
5. $^1/_2$—1 Min. 1 %ige Essigsäure (kann fortfallen).
6. Abspülen in Wasser, Trocknen, Einlegen.

   Für alle Bakterien ohne weitere Zusätze zur Beize verwendbar. Auch Kapseln werden gefärbt, besonders wenn vor der Beizung $^1/_2$—1 Min. 5 %ige Essigsäure eingewirkt hat, dann in Wasser abgespült worden ist.

Modifikation von Coerner-A. Fischer:

1. Beizen mit folgender Lösung unter Erwärmen ohne Kochen 1 Min.: 2 g Tannin, 20 g Wasser, 4 g Ferrosulfatlösung 1 : 2, 1 ccm gesätt. alkohol. Fuchsinlösung.
2. Abspülen in Wasser.
3. Färben mit Anilinfuchsin- oder Karbolfuchsinlösung oder gesätt. wässer. Fuchsinlösung.
4. Abspülen in Wasser, Trocknen, Einlegen.

   Für alle Bakterien ohne weiteren Zusatz zur Beize brauchbar.

B. Geisselfärbung nach van Ermengem:

1. Behandeln der Ausstriche $^1/_2$ Stunde in der Kälte oder 5 Minuten bei 50—60° in einer Mischung von einem Teil 2 %iger Osmiumsäure mit zwei Teilen 10 bis 25 %iger Tanninlösung, welcher 4—5 Tropfen Eisessig

auf 1000 ccm zugesetzt worden sind. Die Mischung soll womöglich einige Tage alt sein.

2. Abspülen in Aq. destill.
3. Abspülen in Alkohol absol.
4. Eintauchen in 0,25—0,5 (— 1,0) %ige Lösung von $AgNO_3$ in Aq. oder auch Alkohol absol. für einige Sekunden.
5. Ohne Abspülen in folgende Lösung: Acid. gallic. 5,0, Tannin 3,0, Natr. acet. fus. 10,0, Aq. dest. 350,0 für einige Augenblicke.
6. Zurück in 4. und darin unter stetiger Bewegung lassen, bis die Lösung sich zu schwärzen beginnt.
7. Abspülen mit viel Wasser. Erscheint die Färbung nicht intensiv genug, Wiederholung von 5—7. Ist sie zu stark, Eintauchen in Chlorgoldlösung 1 : 3000 für einen Augenblick, sorgfältig abspülen, Präparat einige Tage am Licht liegen lassen.
8. Trocknen, Einlegen in Balsam.

Bakterien schwärzlichbraun, Geisseln schwarz.

Das Verfahren ist für alle beweglichen Bakterien in gleicher Weise brauchbar. Am besten bei hellem Tageslicht auszuführen.

C. Geisselfärbung nach Zettnow: Klin. Jahrb. Bd. XI S. 379 (ältere Vorschrift Zschr. f. Hyg. Bd. 30 S. 95).

1. Herstellung der Ausstriche nach dem Osmiumsäureverfahren (s. S. 49).
2. Beizen. Deckglas in Flamme fixieren, mit der Schicht nach unten in Blockschälchen legen, reichlich mit Beize übergiessen und 5—7 Min. auf eine etwa 100° heisse Eisenplatte stellen. Herstellung der Beize: Lösung von 10 Tannin in 200 Aq. erwärme auf 50—60°, adde 36—37 ccm Lösung von 2 g Tartarus stibiatus in 40 Aq., erhitze bis Niederschlag gelöst. Ist die Trübung der erkalteten Beize sehr stark (milchweiss, — Probe in Reagenzglas giessen), adde etwas Tannin, ist die Beize klar, adde 1 ccm der Tart.-Lösung. Die Beize soll keinen Bodensatz bilden, beim Erhitzen völlig klar werden. Etwas Thymolzusatz sichert die Haltbarkeit. Sie ist heiss und klar anzuwenden.
3. Schälchen abkühlen lassen, bis die Beize sich zu trüben beginnt, dann sehr sorgfältig abspülen mit Wasser.
4. Auf Deckglas 3—4 Tr. Äthylaminsilberlösung geben und erhitzen bis sie stark raucht und die Ausstrichränder

(nur diese!) schwarz werden. Äthylaminsilberlösung: 2—3 g Silbersulfat (hergestellt aus Silbernitratlösung durch Zusatz von Magnesium- oder Natriumsulfat) schüttele kräftig mit 200 Aq. zur Erzielung einer gesättigten Lösung. Eine beliebige Menge davon + Aq. $\overline{aa}$ versetzte im Reagenzglas mit 33 % iger (käuflicher) Äthylaminlösung, bis anfänglicher Niederschlag eben wieder gelöst ist. Haltbar, allmähliche Braunfärbung belanglos.

5. Abspülen in Wasser. Geisseln schwarz, Grund völlig hell.

VI.

Besondere Nährsubstrate, Kultur- und Färbe-Methoden

für die wichtigsten pathogenen und einige andere Mikroorganismenarten.

1. Milzbrandbazillen.

Wachsen auf allen üblichen Substraten, verflüssigen Gelatine, färben sich leicht, auch nach Gram. Unbeweglich. Sporenbildung am schnellsten bei Brütwärme, nicht unter 16°, nicht im Tierkörper.

Nachweis im Körper durch Kultur und Tierversuch (Verimpfung auf Mäuse oder Meerschweinchen subkutan). Bei faulem Material versagt bisweilen die Tierimpfung, während die Platte noch positive Resultate gibt. — Im Blute von Tieren, das nicht sofort untersucht werden kann, halten sich die M.-Baz. bei Antrocknung in dicker Schicht auf Glas längere Zeit lebensfähig. — Zum Nachweis an Haaren usw. die Haare mit alkal. Bouillon waschen, diese $^1/_2$ Std. auf 80° erhitzten (wobei die M.-Sporen überleben), zentrifugieren, Bodensatz auf Tiere und Platten verimpfen.

Kapselfärbung nach den Methoden S. 48. Ferner durch Färbung mit Safraninlösung (solve 3 g in 100 g fast kochend heisser Aq. dest., filtriere nach Erkalten) unter Erwärmen, oder durch Färbung mit Formalin-Gentianaviolett (kalt gesätt. Lösung des Farbstoffes in Formalin, filtriert; Ausstriche ohne

Fixierung 30 Sek. kalt färben). Untersuchen in Wasser! Die Kapselbildung der M.-Baz. kann bisweilen zur Unterscheidung zwischen ihnen und ähnlichen Baz. in faulen Tierkadavern helfen, nie aber allein ohne positive Kultur- oder Tierversuche Entscheidung geben.

Herstellung von Sporenfäden; Agar- oder Kartoffelkulturen, in denen das Mikroskop vollentwickelte Sporen gezeigt hat, werden abgekratzt und mit sterilem Wasser verrieben. 1—2 cm lange sterilisierte Seidenfädchen (Turnerseide Nr. 4 oder 5) werden mit der Aufschwemmung getränkt (oder auch direkt im Agarkulturbelag gewälzt), in sterilen Doppelschalen im Dunkeln bis zum Trockenwerden liegen gelassen und dann dunkel in Reagenzgläschen aufgehoben. (Vorsicht beim Aufnehmen! Gefahr der Sporeninhalation!) Als Testobjekt für Desinfektionsprüfungen gebraucht, vgl. S. 31 u. 32 Nr. 9 u. 10. Vertragen meist 2—5 Min. Dampf von 100°.

2. Tuberkelbazillen.

Als Nährböden für Tb. eignen sich von den üblichen Substraten: Blutserum (für Züchtung aus dem Körper von den allgemein üblichen Nährböden am besten); Glyzerinagar (4 % Glyzerin Optimum); Glyzerinkartoffeln (Keile auf ziemlich langem Glasröhrchen ruhend — Seite 17 — in 4—10 %igem Glyzerinwasser gekocht, dieses dann bis etwas unterhalb des Kartoffelstücks abgegossen); Glyzerinbouillon (Wachstum nur von schwimmenden Partikeln an der Oberfläche aus). Züchtung bei 37°; sehr langsames Wachstum. Eintrocknen der Röhrchen durch Gummikappe verhüten. So gut wie kein Wachstum auf Gelatine, Peptonagar etc. und bei Zimmertemperatur. Unbeweglich.

Als Spezialnährböden sind zu empfehlen (Wachstum schon nach 8 Tagen üppig); Hesses Heydenagar (s. S. 57) und Hirnnährböden nach Ficker: Fein zermahlenes Hirn mit Aq. dest. $\overline{aa}$ unter stetem Umrühren zum Kochen erwärmt, 1/4 Std. gekocht, dann koliert, bis Kolatur leicht breiig. Mische diese ohne Neutral. $\overline{aa}$ mit 2,5 %iger Lösung von Agar in Aq. dest., adde 3 % Glyzerin, sterilisiere etc. Röhrchen gut mischen und schnell erstarren lassen, ehe Hirn- und Agarschicht sich trennen!

Züchtung aus menschlischen Körpergeweben, Auswurf usw. durch Tierimpfung (S. 58) oder durch direkte Aussaat (bei Gegenwart anderer Bakterien nach B 1 a u. b (S. 57).

Färbemethoden für Tuberkelbazillen.

Die Tb. färben sich schwer, halten aber, einmal gefärbt, die Farbe auch sehr fest. Die folgenden Methoden stellen nur die Tb. (und einige ähnliche Mikrobien, sog. säurefeste; bezüglich der Unterscheidung vgl. S. 59) mit der ersten Farbe tingiert dar, während die anderen Bakterien und die Gewebselemente die zur Nachfärbung benutzte Farbe annehmen.

a) Am empfehlenswertesten:

Für Ausstrichpräparate:

1. Färben mit Anilinwasser- oder Karbol-Fuchsin 2 Min. unter wiederholtem Aufkochen.
2. Entfärben 2—5 Sek. in 5 %iger Schwefelsäure oder 25 %iger Salpetersäure.
3. Abspülen in 70 %igem Alkohol, bis das Präparat farblos erscheint. (Wird dies nicht schnell genug erreicht, Wiederholung von 2 und 3.)
4. Nachfärben mit gesättigter wässeriger Methylenblaulösung oder mit Loefflerscher Methylenblaulösung (S. 40) 1 + 3 Wasser 5—10 Sek.
5. Abspülen in Wasser.

Für Schnitte.

1. Färben in Anilinwasserfuchsin (Karbolfuchsin nicht so gut, weil Präparate oft unreiner) 15 Min. bis 24 Std.
2. Entfärben 10 Sek. in 5 %iger Schwefelsäure oder 25 %iger Salpetersäure.
3. Abspülen in 70 %igem Alkohol, bis das Präparat farblos wird (um dies schneller zu erreichen, kann 2 und 3 rasch wiederholt werden).
4. Nachfärben in Methylenblaulösung, am besten Loefflerscher (S. 40) 1 + 3 Wasser 2—5 Min.
5. Abspülen in 1/4—1/2 %iger Essigsäure.
6. Entwässern in absolutem Alkohol.
7. Aufhellen in Zedernöl.

Tb. rot, Gewebe und andere Bakterien blau.

Für Ausstriche wie für Schnitte kann man bei 1. auch Anilinwassergentianaviolett, dann bei 2. die 25 %ige HNO_3 und bei 4. schwache Lösungen von Fuchsin, Safranin oder Bismarckbraun anwenden. Die Tb. werden dann blau, die Gewebe rot oder braun gefärbt.

b) Verfahren von Fränkel und Gabbet.

Für Ausstriche.

1. Färben in Anilinwasser- oder Karbol-Fuchsin 2 Min. unter Aufkochen.
2. Entfärbung und Gegenfärbung findet zusammen statt in einer Mischung von Alkohol 30, Aq. 50, HNO_3 20 + soviel Methylenblaupulver als sich löst (oder in H_2SO_4 10,0, Aq. dest. 30,0 + Methylenblaupulver bis zur Sättigung).
3. Abspülen in Wasser oder
   1. Färben mit Anilinwasser-Gentiana- oder Methylviolettlösung 2 Min. unter Aufkochen.
   2. Entfärbung und Gegenfärbung ($1^1/_2$—2 Min.) findet zusammen statt in einer Lösung von Alkohol 70, HNO_3 30 + soviel Bismarckbraun wie sich löst.
   3. Abspülen in Wasser.

Das Verfahren b) hat gegen a) den Nachteil, dass man nicht alle Stadien der Entfärbung und Gegenfärbung mit dem Auge verfolgen kann; es lässt ausserdem bisweilen andere säurefeste Baz. gefärbt, so dass es sich zu sicherer Diagnose nicht eignet.

Untersuchung von Sputum auf Tuberkelbazillen

(ähnlich Untersuchung von Exsudaten, Urin, Milch und dergl.):

A. Man nimmt zunächst die mikroskopische Untersuchung von Ausstrichpräparaten vor. Bei Sputumuntersuchung bringt man eine sogenannte „Linse“ aus dem auf schwarzlackiertem Teller (oder in einer Glasschale, die auf schwarzem Untergrunde seht) ausgebreiteten Auswurf auf ein Deckglas oder einen Objektträger, verreibt sie mit der Platinöse gleichmässig oder zerquetscht sie mit einem anderen Deckglase oder Objektträger und färbt nach einer der angegebenen Methoden. Urin, Exsudate, durch Lumbalpunktion entnommene Cerebrospinalflüssigkeit usw. zentrifugiert man und macht Präparate vom Bodensatz. Die Färbung eines Präparates ist nur dann als gelungen anzusehen, wenn ausser den Tb. nichts (ausgenommen höchstens leichte Tinktion von Plattenepithelien und Zellkonturen) in der für ihre Darstellung benutzten Farbe erscheint. — Findet man bei Untersuchung mehrerer Präparate keine Tb., so verwendet man Anreicherungsverfahren (B) oder den Tierversuch (C).

Niet aan te raden volgens Dr Klopstock

B. Anreicherungsverfahren. Als solche kommen in Betracht:

1. Biologische Verfahren: Schnelle Vermehrung der Tb. auf geeigneten Nährböden.

a) Aussaat auf Heydenagar nach Hesse. Solve 5 g Nährstoff Heyden in Aq. dest. 50,0 unter Quirlen, füge die Auflösung zu einer Lösung von NaCl 5, Glyzerin 30, Agar 10—20, Normalsodalösung 5 in Aq. dest. 950, koche unter stetem Rühren 15 Min., filtriere im Dampfstrom. Fülle nach Sterilisieren den Nährboden in Doppelschälchen, lasse erstarren und verteile eine „Linse" des Sputums, ev. nach wiederholtem Waschen in sterilem Wasser, auf der Oberfläche fein in einzelne Flöckchen. Bei 37° vermehren sich die Tb. auf diesem Substrat sehr schnell, sind schon nach 6—7 Stunden zahlreich, bilden nach 2—7 Tagen (Schälchen durch Einstellen in feuchte Kammer vor Eintrocknung bewahren!) für das blosse Auge sichtbare Kolonien, während die Entwickelung der anderen Sputumbakterien sehr behindert ist. Untersuchung im Klatschpräparat. Sehr gutes Verfahren zur Schnelldiagnose bei Tb. armen Sputis. Gewinnung von Reinkulturen durch Fortzüchtung. — Man kann auch das Sputum mit der 5 fachen Menge der angegebenen Nährstoff Heyden-Lösung (ohne Agarzusatz) versetzen und 24 Std. bei 37° bebrüten, wobei sich die Tb. vermehren, und dann nach dem Sedimentierverfahren S. 58 c behandeln. (Jochmann.)

b) Aussaat auf Glyzerin-Wasser-Agar nach Hesse. (C. B. I Or. 35 S. 386.) Agar 1, Glyzerin 3, Aq. dest. 96 gekocht, filtriert, zu je 20 ccm in Reagenzgläser, die kein Alkali abgeben (von Schott-Jena), gefüllt, sterilisiert. Der flüssig gemachte Röhrcheninhalt erhält beim Gebrauch soviel Zusatz von $^1/_{10}$ Normalkalilauge, dass die Reaktion gegen rotes Lackmuspapier genau der des zu untersuchenden Sputums entspricht; dann wird er in Petrischalen ausgegossen. Auf die erstarrte Plattenoberfläche wird das möglichst von Mundschleim freie Sputum in Menge einer Linse aufgetragen und darauf in viele kleine Flöckchen zerzupft. Nach 1—2 täg. Bebrüten bei 37° sind Tb. im Klatschpräparat nachweisbar.

2. Sedimentierverfahren: Verflüssigung des Sputums, infolge deren die Tb. sich absetzen können oder sich

mit der Zentrifuge ausschleudern lassen (nur mikroskopischer Nachweis, nicht Züchtung möglich).

a) Nach Biedert-Mühlhäuser-Czaplewski. Sputum mit 2—4 facher Menge 0,2 %iger NaOH in Zylinder mit Gummistopfen 1 Min. kräftigst schütteln oder rühren. Falls noch nicht gleichmässig flüssig, noch mehr der NaOH zusetzen und wieder tüchtig schütteln, bis die Flüssigkeit homogen ist. Dann unter Umrühren in Porzellanschale erhitzen bis zum Sieden. Nun 1—2 Tr. Phenolphthaleinlösung zufügen und tropfenweise 5 %ige Essigsäure unter starkem Umrühren, bis die Rotfärbung eben verschwindet (nicht mehr!). Dann absitzen lassen im Spitzglase oder zentrifugieren nach Zusatz des doppelten Volumens 96 %igen Alkohols; das Sediment zu gefärbten Präparaten verarbeiten.

b) Nach Dahmen. Man erhitzt das Sputum 15 Min. im Dampfstrom (gleichzeitig Sterilisierung!), lässt absitzen oder zentrifugiert, verreibt den Bodensatz im Achatmörser und macht davon Präparate. — Es genügt schon Erhitzen auf 70 ° unter öfterem Schütteln.

c) Nach van Ketel. Man mischt in einem weithalsigen 100 ccm-Fläschchen 10 ccm Wasser, 6 Acid. carbol. liquef. und 10—15 ccm Sputum, schüttelt durch, füllt mit Wasser zu 100 auf, schüttelt wieder, lässt im Spitzglase absitzen oder zentrifugiert wie bei a. Präparate vor der Färbung in Äther-Alkohol $\overline{aa}$ abspülen.

d) Nach Spengler. Man mischt das Sputum mit lauwarmem, durch Sodalösung alkalisierten Wasser $\overline{aa}$, schüttelt mit 0,1—1,0 g Pankreatinpulver gut durch und bewahrt bei 37 °. Sofort oder nach 2—3 Stunden setzt man einen Karbolkristall von 0,2—1,0 g zu. Sobald sich Sediment gebildet hat, untersucht man dies nach Abgiessen der Flüssigkeit. Falls das Sediment zu gross erscheint, wird nochmals alkalisiertes Wasser und Pankreatin zugesetzt etc. Nicht zu lange verdauen lassen! Reaktion stets alkalisch halten!

C. Tierversuch. Führt langsamer als A. und B., aber am sichersten zum Ziel. Nach subkutaner (vorzuziehen, wenn Impfmaterial reich an anderen Bakt. ist) oder intraperitonealer Impfung mit Tb-haltigem Material sterben Meerschweinchen, meist in 4—8 Wochen, mit zahlreichen Tuberkelknoten in Leber, Lunge, Milz und Verkäsung der Lymphdrüsen. In den Knoten, die stets zur Vermeidung von Ver-

wechslungen mit ähnlichen Erkrankungen mikroskopisch zu untersuchen sind, zahlreiche Tb. Zur Züchtung zerquetscht man Knoten zwischen zwei sterilen Objektträgern und sät viele, mindestens stecknadelkopfgrosse Stücke auf erstarrtem Blutserum aus. Züchtung s. S. 54; Wachstum beginnt erst nach 8—14 Tagen deutlich.

Der Tierversuch liefert Differentialdiagnose gegenüber anderen säurefesten Bakterien: Lepra- und Smegmabaz. (diese im Urin! — s. unten) sind nicht für Tiere pathogen. In Butter, Milch, Mist, auf bestimmten Pflanzen, manchmal auch im menschlichen Körper (z. B. bei Lungengangrän) kommen wie Tb. färbbare und für Meerschweinchen ähnlich pathogene Bazillen vor, die sich aber durch die Kultur (Wachstum schnell auf allen Nährböden, auch bei Zimmertemperatur) unterscheiden.

Tötet man mit Tb. geimpfte Meerschweinchen 2—3 Wochen post infectionem, so findet man meist schon die Lymphdrüsen zunächst der Infektionsstelle verkäst und deutlich entwickelte Tb.-haltige Knötchen in den inneren Organen. Zur Beschleunigung der Diagnose kann man also, ohne den Tod der Tiere abzuwarten, sie nach dieser Zeit töten.

3. Smegmabazillen.

Im Präputial- und Vulvasekret, im Urin (die späteren Portionen des mit dem Katheter nach Säuberung der äusseren Genitalien entnommenen Urins sind meist frei von den Bazillen), in der Analfalte, im Ohrenschmalz, gelegentlich auch an anderen Körperstellen. Kürzer und zarter als Tb., sehr zahlreich auf Epithelien liegend; Tb. bei Nierentuberkulose dagegen meist in Haufen für sich allein ohne Zellen zusammenliegend.

Züchtung auf Blutserum versuchen.

Färbung: Sind säureresistent, ähnlich wie Tb. und Leprabazillen. Zur Unterscheidung von Tb. vor allem Tierversuch (s. S. 58 sub C), auch folgendes Färbeverfahren: 1. Färben mit Karbolfuchsin 2 Min. unter Kochen. 2. Abspülen mit Wasser, Trocknen. 3. Behandeln mit einer Mischung von Alkohol absol. 97,0 und HCl 3,0 für 10 Min. 4. Abspülen in Wasser. 5. Gegenfärben in gesätt. alkohol. Methylenblaulösung + Aq. $\overline{aa}$. Tb. bleiben rot gefärbt, Smegmabaz. nicht.

4. Leprabazillen.

Kultur bisher nicht sicher möglich. Zu versuchen durch Bebrüten von Lepraknotenstücken mit Zusatz von etwa 0,8 %-iger NaCllösung.

Färbung wie für Tuberkelbaz. angegeben, doch Säure- und Alkoholbehandlung kürzer. Die Leprabazillen finden sich in den leprös erkrankten Geweben viel massenhafter als die Tb. in tuberkulösen Geweben und sind leichter färbbar als die Tb. Unterscheidung zwischen beiden nach Baumgarten:

1. Färbung in verdünnter alkohol. Fuchsinlösung 6—7 Min. (5—6 Tr. gesätt. alkohol. Lösung auf ein Uhrschälchen voll Wasser.)
2. Entfärben $^1/_4$ Min. in Alkohol 10 + HNO_3 1.
3. Abspülen in Wasser. Für Schnitte statt dessen absoluter Alkohol, Zedernöl.

Bei dieser kurzdauernden Färbung tingieren sich die Leprabaz. schon, die Tb. noch nicht. Ausserdem Tierversuch (s. S 58 sub C) zur Unterscheidung; Leprabaz. sind für Tiere nicht pathogen.

5. Rotzbazillen.

Züchtung auf Blutserum, Agar und Kartoffeln (hier rotbrauner Belag) bei Körpertemperatur.

Reinkulturen aus Eiter rotzkranker Tiere oder Menschen werden am leichtesten mit Hilfe des Tierkörpers erzielt. Feldmäuse gehen 5—8, Meerschweinchen ca. 14 Tage nach subkutaner oder intraperitonealer Injektion des Eiters ein; die Rotzknoten in ihren inneren Organen enthalten die Bazillen in Reinkultur. (NB. Die Hodenschwellung und Vereiterung, die nach Impfung mit rotzverdächtigem Material in die Bauchhöhle von männlichen Meerschweinchen (Strausssche Methode der Diagnose) nach ca. 2 Tagen, wenn Rotzbazillen zugegen sind, eintritt, ist nicht ganz sicher pathognomonisch für Rotz; auch andere, bei malleusähnlichen Prozessen vorkommende Bazillen verursachen sie. Stets mikroskopische und kulturelle Untersuchungen vornehmen, ev. Agglutinationsprobe anstellen (s. Kleine, Zschr. für Hyg. 42. S. 183). Diagnostikum aus abgetöt. Baz. für Agglutinationsprüf. von Blutserum s. Ficker, Hyg. Rdsch. 1905, S. 649.

Färbung mit Loefflerscher Methylenblaulösung (S. 40) oder der S. 64 angegebenen Färbemethode Loefflers oder nach den Nicolleschen Methoden (S. 42e u. 43f. Nach Gram nicht darstellbar.

Besondere Färbemethoden:

a) Nach Loeffler:

α) In Ausstrichpräparaten:

1. Färbung in Loefflerscher Methylenblaulösung (s. S. 40a)

oder in Anilinwassergentianaviolettlösung + 0,01 %iger Kalilauge $\overline{aa}$ 5 Minuten.

2. Schnelles Abspülen in 1 %iger Essigsäure, die durch Tropaeolin 00 (so der Name des Farbstoffes) in wässeriger Lösung etwa rheinweingelb gefärbt ist.
3. Schnelles Abspülen in Aqua dest.

β) In Schnitten:

1. Einlegen der Schnitte einige Minuten in 0,01 %ige Kalilauge.
2. Färbung wie bei α 1 für 30 Min. und länger.
3. Schnelles Abspülen in Aqua dest. 10,0 + 2 Tr. konzentrierter schwefliger Säure und 1 Tr. 5 %iger Oxalsäure.
4. Entwässern in Alkohol absol.; dann Zedernöl usw.

b) Doppelfärbung nach Unna:

1. Antrocknen des Schnittes auf dem Objektträger und Färben mit Kühnes Karbolmethylenblau (s. S. 41) 10 Min.
2. Abspülen in Wasser.
3. Färben 15 Min. in gesättigter wässeriger Tanninlösung + 1 %iger wässeriger Säurefuchsinlösung $\overline{aa}$ (NB. Säurefuchsin ist ein besonderer Farbstoff!)
4. Entwässern in Alkohol. Aufhellen in Bergamottöl. Bazillen und Kerne blau, Gewebe rötlich.

6. Streptobazillen des Ulcus molle.

Züchtun gauf Blut-Agargemisch (S. 101, am besten Menschenblut) möglich (gelingt nicht stets). Kolonien in toto abhebbar. Im Kondenswasser lange Ketten. Kulturen sterben in wenigen Tagen ab.

Färbung in Ausstrichen nach den gewöhnlichen Methoden, nicht nach Gram, in Schnitten mit vorsichtiger Entfärbung. Gut brauchbar sind Nicolles Tanninmethode (S. 42 e) oder Unnas Methode:

1. Färbung mit polychromer Methylenblau-Lösung (von Grübler-Leipzig zu beziehen) 2 Min.
2. Abspülen in Wasser.
3. Schnitt auf Spatel, Abtrocknen mit Fliesspapier.
4. Differenzieren in Glyzerinäther (von Grübler-Leipzig), einige Tropfen auf ein Schälchen Wasser, 1—2 Min.
5. Abspülen in Wasser (sorgfältig!).
6. Abtrocknen auf dem Spatel mit Fliesspapier.
7. Alkohol absol. Bergamottöl. Kanadabalsam.

7. Diphtheriebazillen.

Kulturen bei Temperaturen über 20°, am schnellsten bei Körperwärme, zu erzielen. Bestes Wachstum auf Loefflerschem Blutserum (vergl. S. 15), zumal wenn es aus Hammelblut hergestellt ist. Geringes Wachstum und Bildung weniger charakteristischer Bakterienformen auf Nähragar, Glyzerinagar und den weiter unten angegebenen besonderen Substraten.

Zur Färbung ist vornehmlich die alkalische Methylenblaulösung nach Loeffler (S. 40) geeignet. Färbung auch nach Gram. (Nicht zu stark entfärben!) Unbeweglich.

Diphtheriediagnose.

Entnahme von Untersuchungsmaterial aus dem Rachen vgl. S. 102. Ausstreichen in franktionierter Aussaat (S. 23) auf Loefflerschem Blutserum in Röhrchen oder Petrischalen (s. S. 15 Abs. 3). NB.: Von jedem Posten Serum sind vor seinem Gebrauch für die Diagnose einige Röhrchen durch Besäung mit Db.-Reinkulturen auf Tauglichkeit als Nährboden zu prüfen! Bebrüten bei Körperwärme (zur Not Röhrchen in der inneren Westentasche!) — Statt des Loefflerschen Blutserums werden auch folgende Substrate benutzt:

1. Glyzerinagar. Kolonien bleiben klein, sind daher weniger leicht auffindbar. Verwechslung der Db. mit manchen Pseudodb.-Arten wegen Ähnlichkeit der Form möglich.

2. Alkalialbuminat-Agar nach Deycke.

Alkalialbuminat zu beziehen von E. Merck-Darmstadt, (100 g 11 M.) oder n. S. 86 darzustellen. Davon in Aq. dest. 1000 gelöst 10 g + 10 g Pepton, 5 g NaCl, 20 g Agar, 50 g Glyzerin. Mit konzentr. HCl vorsichtig neutralisieren, dann alkalisieren durch Zusatz vzn $^1/_2$ % kristallisierter Soda. Auf diesem Substrat wachsen Db. mässig gut, aber den Pseudodb. sehr ähnlich. Streptokokken gedeihen bei genügender Alkaleszenz des Nährbodens nicht.

3. Serumagar nach Tochtermann.

2 %ige wässerige Agarlösung + 1 % Pepton, 0,5 % NaCl, 0,3—0 %, Traubenzucker wird filtriert, mit Hammelblutserum, das nicht steril zu sein braucht, $\overline{aa}$ oder im Verhältnis von 3 Serum zu 2 Agar 1 $^1/_4$—$^1/_2$ Std. gekocht, filtriert, in Reagenzgläser gefüllt und sterilisiert (nicht mehr als 1—1 $^1/_2$ Stdn.) dabei kochen, weil Nährwert leidet! — Kolonien gross und leicht erkennbar, aber die Baz. in ihren Formen den Pseudodb. sehr ähnlich.

Vor den drei genannten Substraten verdient das Loefflersche Blutserum weitaus den Vorzug, weil die Db. darauf schnell, üppig und in charakter. Formen wachsen, unterscheidbar von den v. Hofmann-Loefflerschen (Rachen-) Pseudodb. durch die Form der Bazillen, von den Xerosebazillen (Augenpseudodb.) ebenfalls hierdurch und besonders durch die Grösse der Kolonien (Db.kolonien weit grösser!).

Untersuchung der Kulturen von der 6. Std. nach Aussaat an Erfolg versprechend. Bei Röhrchen Ausstrichpräparate von grösseren Partien der Oberfläche und aus dem Kondenswasser, bei Platten Klatschpräparate. Färbung mit Loefflerschem Methylenblau (S. 40). Db. an ihren eigenartigen Formen (gefärbte und ungefärbte Partien im Bazillus abwechselnd, Keulen- und Spindelformen etc.) erkennbar. Wenn keine Db. in mehreren Präparaten auffindbar, häufige Wiederholung der Untersuchung (bis 48 Std. nach Aussaat). Von der 12.—16. Std. an werden meist auch die Kolonien der Db. typisch und leicht erkennbar (halbkugelig, weissgelb, feucht); dann Präparate von verdächtig erscheinenden Kolonien. Ferner empfehlenswert:

Färbung der Polkörnchen nach M. Neisser (Hyg. Rdsch. 1903 Nr. 14):

1. Färben etwa 1 Sek. (auch länger) mit einer Mischung von 2 Teilen Lösung a und 1 Teil Lösung b. Lösung a: Methylenblaupulver (Meth. medicale Höchst) 1,0, Alkohol absol. 20,0, Aq. dest. 1000,0, Acid. acet. glac. 50,0. Lösung b: Kristallviolett Höchst 1,0, Alkohol absol. 10,0, Aq. dest. 300,0.
2. Abspülen mit Wasser und sofort
3. Nachfärben mit Chrysoidin (1 in 300 Aq. ferv. gelöst und filtriert) etwa 3 Sek.
4. Abspülen mit Wasser.

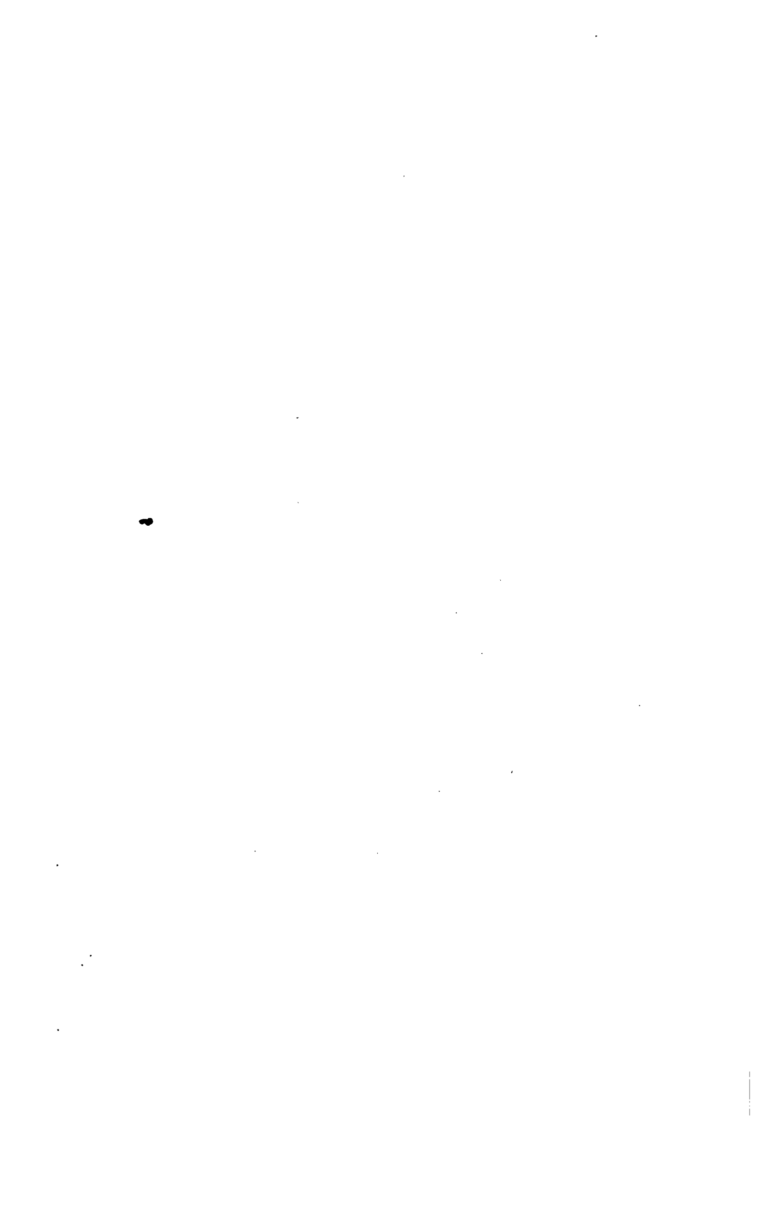
Die Färbung ist anzuwenden sowohl für Belagausstriche wie für 9—20 Std. alte bei 35—36 ° gewachsene Serumkulturen (am besten auf Rinderserum). Db. zeigen dabei an einem Pole oder an beiden blaue Körnchen im braungefärbten Bazillenleibe (auch wohl in der Mitte eins), während die den Db. ähnlichen Bazillen zur angegebenen Zeit die Körnchenfärbung noch nicht aufweisen. Die Methode ist nicht unbedingt zuverlässig, da bisweilen, allerdings selten, auch Pseudodb. (Xerosebaz. ähnliche) die Körnchen wie die Db. zeigen, ferner Db. manchmal erst später oder auch ausnahmsweise gar nicht die Körnchenfärbung

geben. Loeffler (D. m. W. 07 Nr. 5) empfiehlt folgende Färbung:

1. Färben ohne Erwärmen mit wässer. Borax (2,5 %)-Methylenblau (1 %)-Lösung 40,0 + polychromen Methylenblau Unna (von Grübler-Leipzig) 10,0 + 0,05 % iger wässer. Bromeosin extra A. G. (Höchst)-Lösung 50,0. 2. Entfärben mit Tropaeolin 00 (gesätt. wässer. Lös.) 5,0 + Acid. acet. 0,5 + Aq. dest. 100,0. Bazillenleib blassblau, Polkörnchen schwarzblau. — Andere Färbemethoden, s. C. B. I Or. 38 S. 359.

Wenn Zweifel entstehen, ob Db. oder Pseudodb. vorliegen, hat man therapeutisch zu handeln als sei die Diphtherie sicher festgestellt (also Heilserum injizieren, falls dies nicht vorsichtshalber sofort geschehen ist), bakteriologisch aber weiter Reinzüchtung der verdächtigen Baz. vorzunehmen. Sind isolierte Kolonien zum Abimpfen nicht vorhanden, verteile man etwas Material von einer Stelle, an der das mikroskopische Präparat die Baz. zahlreich nachgewiesen hat, in einem Röhrchen mit steriler Bouillon und lege von dieser sofort fraktionierte Aussaaten (S. 23) auf Serum an. Hiervon sobald als möglich isolieren. Oft gelingt auf der zweiten Kulturserie die Differentialdiagnose zwischen Db. und Pseudodb. leichter wegen der grösseren Zahl von Kolonien in der Kultur und von Baz. im Präparat. Falls noch Zweifel bestehen, folgt:

a) Tierversuch. Eine ganz grosse Platinöse 1—2 tägiger bei 37° gewachsener Serumreinkultur oder 0,2—1,00 ccm gleich alter Bouillonreinkultur werden einem Meerschw. von ca. 250 g Gewicht subkutan auf der Brust beigebracht. (Technik s. S. 107.) Handelt es sich um virulente Db., so erkrankt das Tier nach 1 Tage mit starkem Infiltrat an der Impfstelle und stirbt meist nach 2 Tagen. (Organe steril, Nebennieren blutreich, gross, seröser Pleuraerguss, vor allem und stets grosses, oft hämorrhagisches Infiltrat an der Impfstelle.) Bei Injektion der gleichen Dosis Db.-Kultur gemischt mit einer reichlichen Menge D.-Heilserum (0,2 ccm 200 faches Serum und mehr) bleibt das Tier am Leben, die Impfstelle ganz oder fast ganz frei von Reaktion. Pseudodb., in gleichen Kulturdosen wie für Db. angegeben injiziert, machen höchstens minimales Ödem an der Impfstelle (doch auch dies nur sehr selten!), töten nicht; wenn sie überhaupt Reaktion erzeugen, tun sie dies auch bei Injektion in Mischung mit D.-Heilserum.



b) ferner zur Differentialdiagnose Reaktionsprobe: Besäung von sterilisiertem, leicht alkalisch gemachten Fleischwasser (s. S. 8) aus frischem Fleisch zu je 10 ccm in Röhrchen. Db. bilden Säure (in 24—48 Stunden bei 37° ca. 0,35—1,0 $^1/_{10}$ Normal-H_2SO_4 [Indikator Phenolphtalein] entsprechend), von Hofmann-Loefflers Pseudodb. Alkali (ca. 0,2—0,4 $^1/_{10}$ Normal-NaOH entsprechend). Die Bakterien der Xerosebazillengruppe bilden Säure, einzelne so viel wie manche Db.-Stämme; daher ist zwischen diesen die Probe nicht entscheidend. (Ebenso in Nährbouillon; wegen der gelben Substratfarbe genaue Titration hierin schwerer.)

Diphtheriebazillengift: Enthalten in der Kulturflüssigkeit. Züchtung der Db. bei 37° in Kolben mit Bouillon in flacher Schicht. Herstellung der Bouillon aus altem Fleisch, ferner Zusatz von gepulverter Kreide ratsam. Nach 1 bis 4 Wochen keimfrei filtrieren (s. S. 7. 4c), zum Filtrat, das das Gift enthält, $^1/_2$ % Karbolsäure zwecks Konservierung fügen. (Als Normalgift bezeichnet man ein Gift, von dem 0,01 ccm eben genügt, um jedes Meerschw. von 250 g bei subkut. Applikation in höchstens 5 Tagen zu töten.)

Immunisierung s. S. 110.

Diphtherieheilserum von hochimmunisierten Tieren zu gewinnen. Mit 0,5% Karbolsäure konserviert. Normalserum nennt man ein Serum, von dem 0,1 ccm genügt, um das 10 fache Multiplum der eben noch letalen Dosis Normalgift (s. oben) bei Einspritzung unter die Haut im Meerschw.-Körper zu paralysieren. Von 100 fachem Normalserum würde 0,001 ccm genügen etc. Prüfungsmethoden s. bei Ehrlich, Klin. Jahrbuch, Bd. VI.

8. Influenzabazillen.

Kulturen gelingen nur bei Temperaturen über 30° auf Agar, das mit Blut (bes. gut Taubenblut, aus einem Gefäss an der Flügelinnenseite leicht steril zu entnehmen) bestrichen oder noch besser gemischt ist (nur soviel Blutbeimischung nötig, dass die Farbe des Agars eben rötlich ist). Als Nährboden auch Bouillon mit $^1/_2$—1% Blutzusatz brauchbar (gefrieren lassen, wieder auftauen, damit sich Hämoglobin löst). Alle Blutnährböden womöglich vor Besäung erst 24 Stunden bei 37° bebrüten, um Sterilität zu prüfen. — Unbewegliche, sehr kleine Baz. Infizierbar sind nur Affen.

Zur Isolierung der Ib. wird das Ausgangsmaterial, Bronchialsputum (das zunächst durch Abspülen in mehreren Schälchen mit sterilem Wasser nacheinander von anhaftendem Mundschleim befreit werden kann), oder bei tödlich verlaufener Influenzapneumonie Saft aus bronchopneumonischen Lungenpartien mit 1—2 ccm Bouillon verrieben, bis eine gleichmässige, leicht getrübte Emulsion entsteht. Durch diese Verteilung wird erstens bei der nun folgenden Aussaat die Zahl der übertragenen Ib. so weit verringert, dass getrennte Kolonien sich entwickeln können, zweitens das im Ausgangsmaterial enthaltene Hämoglobin so stark verdünnt, dass auf vorher nicht mit Blut bestrichenen Nährböden das Wachstum vollständig ausbleibt. Platinösen voll der Emulsion werden nun auf gewöhnlichem oder Glyzerin-Agar und auf Blut-Agar ausgesät. Nach 24 Stdn. im Brütapparat sieht man auf dem Blutnährboden ganz feine tautropfenartige Kolonien der Ib., auf den gewöhnlichen Nährböden nicht. Kolonien in der Nähe von Staphylococcus aureus-Kolonien können sehr gross werden. — Den Ib. morphologisch u. biologisch sehr ähnliche Baz. im Keuchhustensputum und bei bestimmten Bindehauterkrankungen (Koch-Weekssche Baz.)!

Zur Färbung Loefflersche Methylenblaulösung, besser aber noch eine zehnfach mit Wasser verdünnte Karbolfuchsinlösung (s. S. 40; mehrere Minuten färben!); ferner die S. 64 angegebene Loefflersche Färbung. Die Gramsche Färbung ist nicht anwendbar. Schnitte nach Pfeiffers Methode (s. S. 42) färben.

NB.: Nicht alle heute Influenza genannten Erkrankungen sind wirklich Influenza!

9. Typhusbazillen
(einschl. Paratyphusbazillen).

Kultur der Tyb. auf allen gewöhnlichen Substraten möglich. Wachstum auch bei Zimmertemperatur und auf leicht sauren Nährböden. Reinkulturen am leichtesten aus der Milz, der Gallenblase und der Mesenterialdrüsen an Typhus Gestorbener erhältlich.

Färbung mit allen üblichen Anilinfarben, nicht nach Gram. Kulturpräparate gut auf dem Deckglas fixieren, da sich die Bazillen leicht loslösen. Bei Untersuchung von Schnitten (sehr schonend differenzieren, weil Tyb. sich leicht entfärben!) aus der menschlichen Milz suche man zunächst

mit schwacher Vergrösserung die Bazillenherde auf, die sich bei Färbung mit alkalischem Methylenblau als himmelblaue, bei Färbung mit Karbol- oder Anilin-Fuchsin als glänzend rote, bei Thioninfärbung als leuchtend violette Fleckchen zeigen. (Um grosse Herde zu erzielen, lege man die frische Milz 24 Stdn., zur Verhütung oberflächlicher Fäulnis in ein sublimatbefeuchtetes Tuch gewickelt, in den Brutschrank bei 37°; dabei vermehren sich die Tyb. reichlich. Dann härte man.) — Keine Sporenbildung.

Differentialdiagnose von Ty. und Ty. ähnl. Bazillen
(Bact. coli, Paratyphusbaz., Ruhrbaz. usw.).

1. Tyb. sind lebhaft beweglich (ähnlich Ameisenzügen), besitzen zahlreiche, lange, leicht abreissende peritriche Geisseln, die sich durch Loefflersche Beize mit Zusatz von 1 ccm 1%iger NaOH (näheres s. S. 50) gut darstellen lassen.

2. Tyb. bilden in Gelatineplatten rein graue bis gelbliche, runde, ovale oder wetzsteinförmige tiefe Kolonien und sehr zarte graue schleierartige tiefgefurchte oberflächliche Kolonien. Die Kolonien werden erst nach mehreren Tagen leicht braun. Keine Verflüssigung.

3. Tyb. wachsen auf Kartoffeln als kaum sichtbarer Rasen. Aussaat der zu vergleichenden Kulturen (Tyb. und Tyb. ähnliche) auf Stückchen derselben Kartoffel oder an verschiedenen Stellen der gleichen Kartoffelscheibe.

4. Tyb. wachsen in Milch, bringen sie aber nicht zur Gerinnung. (Bebrütung bei 37° mehrere Tage.)

5. Tyb. produzieren in Lackmusmolke (S. 30) nicht mehr als 3% $^1/_{10}$-Normalsäure. (Molke bleibt fast klar.)

6. Tyb. vermögen Traubenzucker nicht zu vergären. (Prüfung s. S. 28! empfehlenswert Stich in Zuckeragar oder Besäung von Zuckerbouillon in Gärröhrchen. Optimum 37°).

7. Tyb. bilden kein Indol. (Prüfung s. S. 31).

8. Tyb. geben Proteinochromreaktion (s. S. 31).

9. Tyb. verändern die Farbe von Neutralrotagar nicht (zu Nähragar mit 0,3—0,5—0,75% Agar und 0,3—0,5% Traubenzucker 1% kalt-gesätt. wäss., im Dampf steril. Neutralrotlösung fügen. Besäung im Stich in hochgefülltem Röhrchen oder durch Verteilen im verflüss. Substrat. Statt Agar kann man auch 10% Gelatine zusetzen, ebenfalls bei 37° halten. Bact. coli u. a. färben grün-fluoreszierend, entfärben später ganz und bilden zum Teil auch Gas).

10. Tyb. lassen dünne Lackmuslösung + 1 % Nutrose, 0,5 % NaCl, 1 % Milchzucker (bereitet mut. mut. wie das Lackmusnutroseagar S. 75) bei 37° binnen 24 Std. unverändert (Unterscheidung von Bact. coli, das Gas bildet, die Lösung rot färbt und gerinnen macht); enthält dieselbe Lösung statt Milchzucker 1 % Traubenzucker, so färben Tyb. sie rot und koagulieren sie in 24 Stdn. bei 37° (Unterscheidung von Ruhrbaz., die binnen 24 Stdn. nur rot färben, erst später Koagulation bewirken). Malachitgrünlösungen mit ähnlichen Reaktionen s. Loeffler, D.m.W. 1906, Nr. 8.

Es gibt Mikrobien, die sich nur durch einzelne der 10 Proben von Tyb. unterscheiden lassen. So unterscheidet sich Bac. faecalis alcaligenes nur durch Probe 5 und die im Wesen gleiche Probe 10 (bildet Alkali) sicher, der Ruhrbaz. nur durch Probe 1 (mangelnde Beweglichkeit), 10 und eine weitere sub Ruhrbaz. S. 80 unter 6 angegebene Reaktion. Auch die **Paratyb.**, die dem Ty. klinisch gleichende Erkrankungen erzeugen und von denen man zwei Typen unterscheidet, sind in vielen Eigenschaften ähnlich. (Der seltene **Paratyb. A** bildet kreisrunde Oberflächenkol. ohne Furchung bei 2, der häufigere **Paratyb. B** ähnliche, aber dicke weissliche, jung irisierende Kol., färbt Kartoffel braun, hellt Milch unter Alkalibildung allmählich auf, macht Lackmusmolke nach 8—10 Tagen alkalisch; beide bilden Gas und Fluoreszenz in Probe 9, erzeugen in Lackmus-Traubenzucker-Nutroselösung Gerinnung.) Wenn auch bisher kein Mikroorganismus bekannt ist, der in allen 10 Proben dem Tyb. gleicht, so ist doch das sicherste Mittel zur Diagnose

11. **die Serumreaktion** und zwar in Form der Bakteriolyse im Tierkörper (a) oder der Agglutination (b).

a) **Bakteriolyse im Tierkörper** (sog. Pfeiffersche Reaktion).

Prinzip: Tyb. werden im Peritonealraum des Meerschweinchens, gemischt mit Serum eines hoch gegen Tyb. immunen Tieres injiziert, schnell „aufgelöst“ (zu sichtbarem Zerfall gebracht), nicht aber bei gleichzeitiger Einspritzung von Serum eines normalen Tieres. Ty. ähnliche Baz. werden weder durch Ty.- noch durch normales Serum beeinflusst. (Nur gültig für bestimmte quantitative Verhältnisse von Serum und Kultur und bestimmte Virulenz der Baz.!)

Ausführung. Erforderlich

α) genaue Kenntnis der Wirksamkeit des Immun-Serums (Titerstellung). Diese ist zu bestimmen mit Hilfe virulenter Ty.-kultur, von der etwa $^{1}/_{10}$ Öse = 0,2 mg (Art der Dosierung s. S. 109) in 1 ccm Bouillon aufgeschwemmt ein Meerschweinchen von ca. 250 g bei intraperitonealer Injektion unter Temperaturabfall und starker Vermehrung der Baz. in ca. 24 Stunden tötet. Man verdünnt das Serum so mit Nährbouillon, dass 1 ccm der Mischung 0,01, resp. 0,005, 0,001 ccm oder noch weniger Serum enthält, schwemmt eine Öse 20 stündiger Agarkultur des erwähnten virulenten Ty-stammes (also die 10 fache tödliche Dosis) in jedem ccm Serum-Bouillonmischung auf und injiziert jeden ccm in die Peritonealhöhle je eines Meerschw. (Bauchhaut einschneiden, Muskulatur mit stumpfer Kanüle durchstechen, Einspritzen.) In verschiedenen Zeitabständen (30, 60, 120 Minuten) nimmt man Proben aus dem Peritonealinhalt (Einstossen von Kapillarröhrchen [durch Ausziehen von Glasröhren hergestellt] durch die Bauchmuskulatur am Orte des Hautschnittes; in die Kapillare steigt etwas Peritoneal-Inhalt auf) und untersucht im hängenden Tropfen (Entleeren des Kapillarinhaltes auf ein Deckgläschen durch Erwärmen der Kapillare in der Hand unter Verschluss der oberen Öffnung mit einem Finger). Wenn nach spätestens 2 Stunden die Baz. verschwunden, resp. in Auflösung begriffen sind, höchstens noch vereinzelte, unbewegliche aufgefunden werden, so ist erwiesen, dass die dem Tiere gegebene Serumdose vor der Baz.-wirkung schützt. Das Tier überlebt dann ohne starken Temperaturabfall. Die kleinste Serumdose, die noch diesen Effekt hat, ist der Titer des Serums. Für die Reaktion verwendbares Serum soll womöglich einen Titer von 0,001 oder noch darunter (z. B. 0,0001) haben. (Gewinnung von Immunserum s. S. 110.)

β) Serum eines normalen Tieres der gleichen Spezies, der das das Immunserum liefernde Tier angehört. (Hat ähnlichen schützenden Effekt wie Immunserum erfahrungsgemäss meist erst in Mengen von Zehntelkubikzentimetern.)

γ) Eine ca. 20 stündige bei 37° gewachsene Agarkultur der zu prüfenden Bakterienart.

δ) Zwei Meerschweinchen von ca. 250 g Gewicht, 2 Spritzen, Pipetten, sterile leere und Bouillonröhrchen.

Meerschw. A erhält intraperitoneal injiziert: Aufschwemmung von 1 Öse = 2 mg von der Agarkultur der zu prüfenden Bakterienart in 1 ccm Bouillon-Immunserummischung, die das zehnfache der dem Titer des Serums entsprechenden Serummenge (event. auch ein anderes Vielfaches, aber nie über 0,02 ccm! Näheres s. unter Möglichkeit 3!) enthält. Meerschw. B enthält dieselbe Dosis Kultur in einer Mischung von 0,95 ccm Bouillon und 0,05 ccm des normalen Serums.

Nach 30, 60 und 120 Minuten Untersuchung des Peritonealinhaltes der Tiere (Entnahme mit Kapillare); weitere Beobachtung der Tiere. Es können eintreten:

Möglichkeit 1. Bei Meerschw. A verschwinden die Baz. schnell, das Tier überlebt. Bei Meerschw. B verschwinden die Baz. nicht, vermehren sich vielmehr, das Tier stirbt unter Temperatursturz. Folgerung: Die Kultur ist eine echte Tyb.-kultur, denn das Ty., Immunserum hat sie beeinflusst, das in grösserer Menge angewandte normale Serum nicht.

Möglichkeit 2. Bei Meerschw. A und B verschwinden die Baz., die Tiere überleben. Folgerung: Die Kultur ist zu wenig virulent, um die Probe anzustellen. (NB. Steigerung der Kulturdosis über 1 Öse ist nicht zulässig!) Ev. Versuch zur Virulenzsteigerung mit Durchzüchtung durch den Meerschw.-körper. Z. B.: 1. Tier 2 Ösen intraperitoneal, stirbt. Agarkultur aus dem Bauchhöhleninhalt angelegt, 2. Tier von dieser Kultur 1 Öse intraperitoneal, stirbt. Agarkultur wie vor, davon 3. Tier $^1/_4$ Öse, stirbt. Nun Anstellung der Reaktion mit 1 Öse Kultur + Serum wie oben beschrieben. — Möglichkeit 2 kommt übrigens der Regel nach bei echten Ty.-kulturen nur in Betracht, wenn diese schon längere Zeit fortgezüchtet sind. Frisch aus dem Körper isolierte Tyb. sind fast immer gut virulent.

Möglichkeit 3. Die Baz. verschwinden weder bei Meerschw. A noch B. Beide Tiere sterben. Folgerung: Die Kultur ist keine Tyb.-kultur. Tyb.-kulturen von solcher Virulenz, dass selbst die im Versuch angewandte zehnfache Titermenge des Serums gegen die Infektion mit einer Öse Kultur Meerschw. nicht schützen kann, kommen nicht vor. Gäbe es solche, so würde, wie leicht verständlich ist, die Folgerung nicht gerechtfertigt sein. Die gleiche

Überlegung ergibt aber, dass man bei Verwendung weniger hochwertigen Serums, als oben angegeben, die Folgerung nicht ohne weiteres ziehen darf. Angenommen, man habe ein Serum von Titer 0,01 ccm, und verwende davon 0,02 ccm (mehr ist nicht zulässig, weil sonst ev. die Wirkungskraft des normalen Serums mit ins Spiel kommen kann!), so gewährt die Serumdosis Schutz gegen die 20fache tödliche Kulturdosis (Titer gegen die zehnfache, die doppelte Titermenge also gegen die 20 fache). Hat die zu prüfende Kultur eine Dosis letalis minima von $^1/_{50}$ Öse und injiziert man dem Tier mit der Serumdosis 1 Öse Kultur, so ist es klar, dass die Serummenge zum Schutze gegen diese Kulturmenge (das 50 fache Multiplum der Dosis letalis minima) nicht ausreicht. Die Baz.-auflösung ist keine vollständige und die Kultur kann dennoch Ty. sein. Daher: Entweder nur hochwertiges Serum verwenden, oder, wenn nur geringwertiges zur Verfügung: Prüfung der Virulenzhöhe der zu untersuchenden Kultur, indem man einer Anzahl von Meerschw. Dosen von $^1/_{10}$—$^1/_{100}$ Öse herab intraperitoneal injiziert. Dann Injektion eines solchen Multiplums der Kultur, dass die zulässige Serummenge (0,02 ccm), wenn die Kultur Ty. ist, sicher zum Schutze ausreichen muss, mit dieser Serummenge gemischt usw. wie oben. Tritt dann Möglichkeit 3 ein, Folgerung wie oben zulässig.

b) **Agglutination** (Gruber-Durham-R. Pfeiffer).

Prinzip: Ty.-immunserum macht noch in sehr grosser Verdünnung Tyb. unbeweglich und ballt sie zu Häufchen zusammen, normales Serum nur in viel stärkerer Konzentration. Auf Ty. ähnl. Baz. wirkt Ty.-immunserum höchstens etwas stärker als normales ein.

NB. Frisch aus dem Körper gezüchtete Tyb. werden bisweilen erst nach Umzüchtung auf künstliche Nährböden von Ty.-serum agglutiniert!

Ausführung. Erforderlich

α) Immunserum von bekannter Wirksamkeit. Zu deren Feststellung fertigt man wie bei S. 69 a) α) Aufschwemmungen von virulenten Tyb. in 0,8 %iger NaCl-Lösung mit verschieden grossen Zusätzen des Immunserums in kleinen Reagenzgläschen (0,5—0,8 cm Weite, 6—8 cm Länge, die nach unten hin konisch zugespitzt sein können) an und

beobachtet erstens, bei welchem Serumzusatz in hängenden, bei 37 ° bewahrten Tropfen nach spätestens 2 Stunden Unbeweglichwerden und Zusammenballen der Tyb. eintritt; die geringste dazu nötige Menge ist der Titer des Serums für den Tropfenversuch; zweitens, bei welchem Serumzusatz im Röhrcheninhalt nach höchstens 2 Stunden eine die Beobachtung mit blossem Auge oder der Lupe in für dem von der Zimmerdecke reflektierten Tageslicht deutlich wahrnehmbare Flockenbildung statthat; die geringste nötige Menge ist der Titer für den Röhrchenversuch (ähnlich Titer für Versuch im hängenden Tropfen festzustellen). — Das Serum soll mindestens in einer Verdünnung von 1 : 1000 0,8 %iger NaCl-lösung im Röhrchenversuch wirksam sein. Noch höher wertiges Serum wird von manchen Autoren für nicht empfehlenswert betrachtet, weil es auch auf Ty.-ähnl. Baz. bis zu einem gewissen Grade einwirken soll. Indessen sind Irrtümer ausgeschlossen, wenn man berücksichtigt, wie viel weniger solch Serum Ty.-ähnl. Baz. als echte Tybaz. agglutiniert.

β) Normales Serum von einem Tier derselben Spezies, der das Immunserum liefernde Tier angehört. Prüfung des Titers des Normalserums entsprechend wie bei α. Das Normalserum soll weit weniger wirksam sein als das Immunserum (z. B. 1 : 20 Normal-, 1 : 1000 Immunserumtiter).

γ) Eine ca. 20stündige bei 37 ° gewachsene Agarkultur der zu prüfenden Bakterienart.

Man stellt sich verschiedene Verdünnungen des Immunserums mit 0,8 %iger NaCl-Lösung her, z. B. 1 : 200, 1 : 300, 1 : 500, 1 : 1000. Doch soll in der am meisten Serum enthaltenden Mischung das Immunserum wenigstens zehnfach so stark verdünnt sein, als der Titer des normalen Serums steht (z. B. Titer des normalen Serums 1 : 20, stärkste Immunserumkonzentration 1 : 200). Von jeder Verdünnung füllt man 1 ccm in ein enges Röhrchen (s. unter α), bezeichnet die Röhrchen genau und schwemmt in jedem eine kleine Öse (2 mg) der zu prüfenden Kultur auf unter sehr sorgfältiger Verreibung des Baz.-materials an der Berührungsstelle von Flüssigkeit und Glaswand bei schräger Haltung des Röhrchens. Auch kann von jedem Röhrchen ein hängender Tropfen hergestellt und wie das Röhrchen im Brutschrank bei 37 ° aufbewahrt werden. —

Ferner prüft man zur Kontrolle die gleiche Menge derselben Kultur ebenso in 1 ccm einer Mischung von Bouillon mit soviel normalen Serums, dass das Serum darin in seiner halben Titermenge enthalten ist (also bei Titer 1 : 20 im Verhältnis 1 : 40). Beobachtung 2 Std. lang alle 10—20 Minuten.

Es können eintreten:

Möglichkeit 1. Im Immunserum ballen sich in allen oder nur in den am meisten Serum enthaltenden Proben die Bazillen, im normalen Serum nicht. Dann ist die Kultur eine Ty.-kultur. (Diese Folgerung ist aber unzulässig, wenn die Differenz zwischen dem Titer für Tyb. und der den geprüften Baz.-stamm agglutinierenden Serumverdünnung sehr gross ist, z. B. Titer 1 : 5000, Agglut. des geprüften Baz.-stammes nur bei 1 : 50, nicht mehr 1 : 100. Dann ev. noch Pfeifferschen Versuch machen, s. S. 68a).

Möglichkeit 2. In beiden Seris ballen sich die Bazillen. (Sehr selten!) Dann kann die Kultur ein Tyb. von geringer Virulenz sein. (Wahrscheinlich, wenn selbst geringste Dosen Immunserum, d. h. viel kleinere als Titermengen, ballend wirken.) Prüfung der Virulenz und ev. Wiederholung der Reaktion nach Steigerung der Virulenz (s. S. 70 Abs. 4).

Möglichkeit 3. In keinem der beiden Sera ballen sich die Bazillen. Dann ist die Kultur keine Ty.-kultur.

Gewinnung des Immunserums s. S. 110. Serum von Ty.-Rekonvaleszenten ist zur Differentialdiagnose nicht verwertbar, da es für diesen Zweck meist zu schwach wirksam ist, ausserdem manchmal auch Ty.-ähnl. Baz. agglutiniert! s. S. 78c).

Bakteriologische Diagnose einer Typhuserkrankung beim Menschen.

Die sicherste Methode ist der Nachweis von Tyb. in den Geweben oder in den Entleerungen; die Agglutinationswirkung des Blutserums erscheint erst allmählich im Verlauf der Erkrankung, bisweilen spät oder gar nicht. Am besten beginnt man, wenn die Möglichkeit vorliegt, mit Nr. 1 oder 2 der nachstehend angegebenen Methoden und schliesst ev. Nr. 3 u. 4, ev. auch 5 an. (2 u. 4 lassen sich an einer Blutprobe ausführen, — vgl. 2 am Schlusse). Aus dem Körper

gezüchtete Tyb.-artige Keime prüfe man stets mittelst aller Kriterien (S. 67 ff. 1—10 u. 11 b oder auch a), da Ty.-artige Erkrankungen vorkommen, die nicht durch Tyb., sondern durch ähnliche Mikrobien hervorgerufen werden.

1. **Untersuchung von Roseolen.** Reinigen der Hautstelle durch mässiges Reiben mit Wattebausch, Alkohol und Äther. Leichter Einschnitt in die Roseole mit Skalpell und mit dessen Spitze sofort, noch ehe Blut austritt, etwas Gewebssaft abschaben, der in Bouillon ausgesät wird. Auf die Wunde ein paar Tropfen Bouillon bringen, um die bakterizide Kraft des austretenden Blutes zu verringern, das so verdünnte Blut in Bouillon aussäen. Identifizierung etwa wachsender Baz. gemäss S. 67 ff. Stets mehrere und nur frische Roseolen untersuchen. Methode hat in etwa $^3/_4$ aller Fälle Erfolg.

2. **Untersuchung von Blut auf Tyb.** Entnahme von 10—20 ccm Blut aus der Vena mediana mittelst Spritze (s. S. 100 Abs. 2). Aussaat zu je 10 Tr. in je 20 ccm Bouillon oder mit ca. 49° warmem Agar (3 zu 1 Blut) gemischt in Platten (Ty.- u. Paraty.-Kol. erscheinen schwarzgrün). Etwa in 90 % der Fälle erfolgreich, schon in der ersten Krankheitswoche. Aussaat in Agar ist vorzuziehen, weil dabei die Zahl der Keime feststellbar ist und bei Verunreinigungen isolierte Kolonien zur Reinzüchtung vorhanden sind. Anreicherung durch Zusatz von Blut (bis zu 2,5 ccm) zu 5 ccm sterilisierter Rindergalle und Züchtung 12—24 Stdn. bei 37°. Dann Aussaat auf Platten (s. unter 3.). Die Gallenmischung, in der das Blut ungeronnen bleibt, empfiehlt sich auch bei Versendung des Untersuch.-Materials. — Auch das bei der Blutentnahme für die Widalprobe (S. 77 Nr. 4) sich ergebende Blutgerinnsel kann zum Nachweis der Tyb. benutzt werden; Aussaat nicht zu kleiner Mengen auf Platten (s. unter 3.). Auch zuvor Anreicherung im Gallenröhrchen (s. oben).

3. **Untersuchung der Fäces auf Tyb.**

a) Mit Hilfe der gewöhnlichen Plattenmethode unter Benutzung neutraler oder nicht ganz neutralisierter Nährgelatine gelingt es nicht selten, besonders von der zweiten Krankheitswoche ab, Tyb. im Stuhl nachzuweisen. Abimpfung zahlreicher ty.-ähnlicher Kolonien von den Platten, Prüfung der Kulturen auf Gärvermögen (s. S. 67 Nr. 6) und weitere Untersuchung derjenigen Kulturen, die nicht Zucker vergären, nach den S. 67 ff. angegebenen Methoden.

b) Weit bessere Erfolge gibt die Methode von v. Drigalski u. Conradi (Zschr. f. Hyg. Bd. 39). Lackmusnutrose-agar: 1,5 kg gehacktes Pferdefleisch 24 Stdn. mit 2 Liter Wasser ohne Erwärmen ausziehen. Das abgepresste Fleischwasser 1 Std. kochen, filtr., versetzen mit 20,0 Pepton sicc. Witte, 20,0 Nutrose, 10,0 NaCl, 1 Std. kochen, filtr., dann 60,0—70,0 feinsten Stangenagar zusetzen, 3 Stdn. in Dampfstrom oder 1 Std. im Autoklaven kochen, schwach alkalisieren gegen Lackmuspapier, filtr., $^1/_2$ Stdn. kochen. Zu diesem, etwas abgekühlten Agar wird zugesetzt 40—50^0 warme Lackmus-Milchzuckerlösung (Lackmuslösung von O. Kahlbaum, Berlin S. O., 260,0 ccm 10 Min. gekocht, dazu chem. reiner Milchzucker 30,0, Kochen 15 Min., nicht länger); gut umschütteln, etwa verschwundene schwach alkal. Reaktion wieder herstellen. Der Mischung zusetzen 4,0 ccm heisser steriler Lösung von 10$^0/_0$ wasserfreier Soda in Wasser, ferner 20 ccm frisch bereiteter Lösung von 0,1 g Kristallviolett B der Höchster Farbwerke in 100 ccm warmer steriler Aq. dest. Von der Mischung teils grosse Schalen (Doppelschalen von ca. 15 ccm Durchmesser) giessen (mindestens 2 mm Schichtdicke!) und vorrätig halten, teils 200 ccm Kölbchen füllen (nicht grosse Kolben voll vorrätig halten, weil deren Verflüss. zu langes Erhitzen fordert). Aussaat fraktioniert auf Oberfläche. Verteilen mit rechtwinklig gebogenem Glasstab. Dünnen Stuhl direkt und nach Verdünnung mit 10—20 facher Menge steriler 0,85$^0/_0$ iger NaCl-Lösung auf mehreren Platten nacheinander verreiben, von festen Stühlen dünne Verreibung mit der genannten NaCl-Lösung aussäen. Besäte Platten mindestens $^1/_2$ Stunde offen stehen lassen, dann mit Deckel nach unten bei 37^0 bebrüten. Nach 14—24 Std. untersuchen. Ty.-kol. 1—3 mm gross, blau, glasig, nicht doppelt konturiert, tautropfenähnlich, ebenso Paraty.-kol. Kolikol. 2—6 mm, leuchtend rot, nicht durchsichtig. Weitere Prüfung abgeimpfter Kol. nach den Differenzierungsmethoden 1—11 (S. 67 ff.), am schnellsten Identifizierung durch Agglutination im hängenden Tropfen (11 b S. 71).

c) Sehr gut ist auch der Fuchsinnährboden nach Endo (Ctrbl. f. Bakt. Abt. I. Or. 35 S. 109). 1 Liter 3$^0/_0$ iges Nähragar (s. S. 11), neutralisiert und mit 10 ccm 10$^0/_0$ iger Sodalös. alkalisiert, wird versetzt mit 10 g chemisch reinem Milchzucker u. 5 ccm gesätt. alkohol. filtrierter Fuchsinlös., dann mit 25 ccm frisch bereit. 10$^0/_0$ iger Natriumsulfitlösung. Auf-

bewahrung des heiss rosa gefärbten, kalt ganz oder fast farblosen Nährbodens im Dunkeln. Besäung in Schalen wie bei b). Ty. u. Paraty -baz. farblos, Kolikol. intensiv rot gefärbt. (Nicht vor 20—22 Stdn. abimpfen!).

d) Kombination der Methode b mit Koffeinnährböden nach Roth, Ficker und Hoffmann (Arch. f. Hyg. 49, S. 199, 229): 100 ccm Rindfleischwasser mit 6 % Pepton Witte u. 0,5 % NaCl werden versetzt mit 38,64 % der zur Neutralisierung bis zur Phenolphtaleinrotfärbung nötigen Menge Normal-NaOH (Prüfung und Berechnung analog wie S. 12 unter 3), dann 10 Min. im Dampf sterilisiert. Dazu werden steril gefügt 105 ccm 1,2 %iger Koffeinlösung und 1,4 ccm 0,1 % iger Kristallviolettlösung (beides für sich kalt in sterilem destill. Wasser und sterilem Gefäss gelöst). In die Mischung wird dünner Stuhl (0,8 bis 0,9 ccm) unmittelbar eingesät. Dickflüss. und fester Stuhl wird mit 1—2 Teilen 1,2 %iger Koffeinlösung in steriler Schale verrieben und durch sterile Watte filtriert; Aussaat von 0,8—0,9 ccm des Filtrats. Nach 13stünd. Bebrüten bei 37 ° Aussaat auf Lackmusnutrosagar (s. S. 75b).

e) Loefflers Grüngelatine: (D. m. W. 1906 Nr. 8). Nährgelatine aus Bouillon (2 kg Rindfleisch zu 5 l Leitungswasser) mit 15 % Gel., 1 % Pepton Witte, 0,5 % NaCl, neutral. für Lackmus, erhält auf je 100 ccm Zusatz von 2 ccm 4 %iger Phosphorsäurelösung u. 3,5 ccm 0,2 %iger wässer. Malachitgrün Kristalle-Chlorzinkdoppelsalz Höchst-Lösung. Je 1 Tr. des Untersuch.-Materials wird zu 2 Röhrchen mit etwa 20 ccm dieser Gelatine zugesetzt, das eine Röhrchen zur Platte ausgegossen, das zweite als Vorkultur bei 37 ° bebrütet. Aus ihm wird nach 12, 18 u. 24 Stdn. je 1 Tr. in Röhrchen mit 20 ccm Grüngelatine übertragen und von diesen wiederum, je nach der Dauer der Bebrütung, drei, zwei oder ein Tr. in neue Röhrchen mit 20 ccm Grüngelatine. Der Inhalt der besäten Röhrchen wird in Schalen ausgegossen, die bei 25 ° bebrütet werden. Ty.-kol. nach 24 Stdn. stecknadelkopfgross, wasserhell, stark glänzend, hellgrau, gekörnt, meist Fortsätze zeigend; nach 36—48 Stdn. erheblich grösser, graugelblich, mit zahlreichen Fortsätzen. Diese Fortsätze (Ausläufer) an den Kolonien sind besonders bezeichnend. Bact. coli gedeiht auf dem Nährboden nicht. — Loefflers Grünagar (ebda): 3 %iges neutral. Nähragar + 5 ccm Normal-NaOH pro Liter + (am Schluss der Steril.) 100 ccm 10 %iger Nutroselös.

pro Liter erhält Zusatz von 1,3 ccm 0,2 %iger wässer. Malachitgrünkristalle-Chlorzinkdoppelsalz Höchst-Lösung. Ausgiessen in Platten, Besäen dch. Ausstreichen von Stuhl. Ev. Vorkultur des Stuhls 6—12 Stdn. bei 37° in Bouillon (neutral. f. Lackmus mit Na_2CO_3) + 5 ccm Normal-NaOH, 10 ccm 1 %iger Nutroselösung und 30 ccm 2 %iger Malachitgrün 120 Höchst-Lösung pro Liter. Ty.-Kol. auf dem Agar durchsichtig, gezackter Rand, Koliwachstum gehemmt, Paraty.-Kol. üppig, grauweiss, schleimig, Nährboden umher entfärbt.

4. **Die Widalsche Serumreaktion.** Prinzip: Das Blutserum Ty.-Kranker besitzt der Regel nach schon nach den ersten 8 Krankheitstagen agglutinierende Kraft gegenüber Tyb. (s. oben 11 b S. 72). Blutserum nicht Ty.-Kranker gibt Agglutination nur in starker Konzentration (s. aber S. 78a!) Blutgewinnung s. S. 100 u. 110. (NB. Die einzelnen Ty.-Stämme können sehr verschieden stark agglutinabel sein, also erst geeigneten mit Immunserum ausprobieren!)

Ausführung der Agglutinationsprobe (vgl. auch die Dienstanweis. f. die zur Ty.-Bekämpfung eingericht. Untersuch.-Ämter-, Veröff. d. K. G. A. 1903 Nr. 36, Besond. Beilage. — Allgemeine Angaben s. auch S. 100):

Mit steriler 0,8 %iger NaCl-Lösung wird das mit einer 1 ccm-Pipette mit $^1/_{100}$-Teilung abgemessene Serum auf das 50 fache verdünnt. Ergibt diese Verdünnung weniger als 2 ccm, so wird die Probe auf Agglutination auf dem Deckglase mit ihr angesetzt, andernfalls mit je 0,5—1 ccm im Reagenzglase (s. S. 71 b α Form und Grösse der Röhrchen).

Mikroskopische Agglutinationsprobe: In je einem auf ein Deckglas gebrachten Tropfen der Verdünnung 1:50, sowie einer aus dieser bereiteten Verdünnung von 1:100 wird von einer Ty.-Kultur auf Agar von nicht über 48 Stdn. Alter, in je zwei ferneren Tröpfchen von je einer Paratyb.-Kultur (Typ. A u. B) eine Nadelspitze Bazillenmaterial soweit verrieben, dass man mit blossem Auge eben eine Trübung sieht; die Platinnadel wird dann abgebrannt, der Tropfen gleichmässig verrieben und als hängender Tropfen weiter untersucht.

Makroskopische Agglutinationsprobe: Aus einem Teil der Serumverdünnung 1:50 wird durch Zusatz einer gleichen Menge 0,8 %iger NaCllösung eine Verdünnung 1:100 hergestellt. Beide Verdünnungen werden sowohl gegen Tyb. wie gegen Paratyb. (Typ. A u. B) auf Agglutinationsfähigkeit im Reagenzglas geprüft. Auf je 1 ccm Serumver-

dünnung wird 1 Normalöse (2 mg — s. S. 110) der Kultur an der Wand des Röhrchens sorgfältig verrieben. Die Röhrchen bleiben 3 Stdn. bei 37° oder vom Abend bis zum nächsten Morgen bei Zimmerwärme stehen.

Prüfung der Reaktion: Die Agglutination ist auch bei den im Röhrchen angesetzten Proben stets durch das Mikroskop zu kontrollieren, ganz besonders, wenn dem Serum Blutkörperchen beigemengt waren. Die auf dem Deckglas allein angesetzte Probe 1:50 hat nur orientierenden Wert. Sind in jedem Gesichtsfeld reichlich Häufchen, auch nur aus 6—7 Baz. bestehend, bei einem ursprünglich nur isolierte Baz. enthaltenden Präparat zu finden, selbst neben noch vereinzelt liegenden Baz., so ist die Reaktion als positiv zu bezeichnen. Ist nur die Röhrchen-Probe 1:50, nicht aber die 1:100 positiv, so ist der Fall verdächtig; es ist dann nach einigen Tagen die Untersuchung mit neu entnommenem Blutserum zu wiederholen. Ist nur die Probe mit dem Paratyb. positiv, so ist ein Fall von Paratyphus zu vermuten, bewiesen aber erst bei Züchtung der Paratyb. aus dem Körper. — Empfehlenswert ist es, von vornherein noch weitere Verdünnungen herzustellen und genau die Wirkungsgrenze des Serums gegen Tyb. und Paratyb. festzustellen.

Die Widalsche Serumreaktion hat zahlreiche Fehlerquellen, insbesondere folgende:

a) Das Blutserum von Menschen, die vor Monaten oder selbst Jahren an Ty. gelitten haben, zurzeit aber andersartig erkrankt sind, kann Tyb. agglutinieren. Auch Serum Ikterischer soll oft erhöhte Agglutinationskraft zeigen.
b) Das Agglutinationsvermögen des Blutserums entwickelt sich bei Ty.-Kranken (zumal bei leicht Kranken) nicht zu bestimmter Zeit der Krankheit, manchmal anscheinend selbst gar nicht. Bei negativem Ausfall der Agglutination und bestehendem klinischen Verdacht auf Ty.-Infektion empfiehlt sich Wiederholung der Probe in Abständen von einigen Tagen.
c) Bei Ty.-Infektion kann das Blutserum auch gegen Paratyb. an Agglutinationskraft wachsen und umgekehrt bei Paraty.-Infektion gegen Tyb. Es ist in Zweifelsfällen ratsam, stärkere Verdünnungen des Serums als 1 : 100, also 1 : 200, 1 : 500 usw., auf ihre Agglutinationswirkung gegen Tyb. und Paratyb. zu prüfen; der die Infektion veranlassende

Baz. wird in der Regel um das Vielfache stärker agglutiniert, als der andere, auf den das Serum nur infolge einer sog. „Gruppenreaktion“ (Familienzusammengehörigkeit ähnlicher Baz.-Arten) in gewissem Masse agglutinierend wirkt. (Auswahl geeigneter Ty.-Kultur für Versuch s. S. 77 Abs. 2.)

Als Unterstützung für die klinische Diagnose behält die Widalsche Reaktion trotzdem bei richtiger Beurteilung grossen Wert. Therapeutisch und sanitätspolizeilich sind Ty. und Paraty.-Infektionen gleichmässig zu behandeln.

Man beschränke sich nie auf die Angabe, dass „die Widalsche Reaktion positiv war“, sondern gebe die Art der Prüfung (Röhrchen- oder Deckglasversuch), die Höhe der wirksamen Serumverdünnung, die Zeit, innerhalb deren die Agglutin. auftrat, und die Stärke der Reaktion (völlige Agglutin. usw.) an.

Ty.- und Paraty.-baz.-zubereitungen zur Anstellung der Widalschen Reaktion, frei von lebenden Keimen, sind von E. Merck-Darmstadt zu beziehen (Fickersches Ty-diagnosticum, B. Kl. W. 1903 Nr. 45); für den Röhrchenversuch brauchbar, bequem für die Praxis. Oder: Eintägige Bouillonkultur der Tyb. + 1 % 40 %igen Formalins 2 Tage bei 37° gehalten, vom Bodensatz abgegossen, im Eisschrank bewahrt. Haltbar, allmählich aber immer leichter agglutinierbar!

5. Im Urin finden sich Tyb. in etwa ¼ aller Fälle, doch in der Regel erst von der 3. Krankheitswoche ab. Untersuchung am besten nach S. 75—76b, c, e.

Nach Überstehen eines Ty. kann Bazillenausscheidung mit Stuhl und Urin noch Monate und Jahre enthalten. Also bei zweifelhaften Krankheitsfällen nach Anamnese forschen!

Isolierung von Tyb. aus Wasser.

Am einfachsten: Aussaat des Wassers entsprechend wie bei Wasseruntersuchung im allgemeinen (vergl. S. 103), aber in den S. 75 ff. gen. Substraten (ev. Ausstreichen des Bodensatzes vom zentrifug. Wasser auf der Oberfläche). Auch Vorkultur (s. S. 74 ff) versuchen. Anlage einer grösseren Zahl von Platten. Abimpfung der verdächtigen Kolonien, Prüfung dieser auf Gärvermögen und bei negativem Ausfall weiter

gemäss S. 67 ff. Besondere Untersuchungsverfahren gibt es zahlreich, vgl. z. B. Literatur bei Müller, Zschr. f. Hyg. 51, S. 1; sie sind aber noch nicht hinreichend bewährt.

10. Ruhrbazillen.

A. Shiga-Krusescher Typus.

In Form und Wachstum den Typhusbaz. ausserordentlich ähnlich. Züchtung aus Fäces (Schleimflöckchen) auf Lackmusnutroseagar (s. S. 75 b, mit oder ohne Kristallviolettzusatz bereitet. Wachstum wie Typhusbaz.). Blutserum Ruhrkranker zeigt erst spät Agglutinationswirkung auf Ruhrbaz.; Agglutination bei Serumverdünnung 1 : 50 für Ruhr beweisend.

Wichtigste Merkmale:

1. Unbeweglichkeit (aber lebhafte Molekularbewegung), Fehlen von Geisseln (Unterscheidung von Typhusbaz.).
2. Keine Vergärung von Traubenzucker (Prüfung s. S. 67 sub 6).
3. Keine Indolbildung (Prüfung s. S. 31).
4. Säurebildung in Lackmusbouillon wie Tyb. (s. S. 67 sub 5).
5. Wachstum auf Lackmusnutroseagar wie Tyb. (s. S. 75 sub b); Nährboden mit oder ohne Kristallviolettzusatz bereitet!
6. Wachstum in Lackmusnutroseagar mit Mannit (wie S. 75 sub b hergestellt, doch statt Milchzucker gleiche Mengen Mannit). Ruhrbaz. lassen in der Stichkultur die oberen Schichten unverändert, die tieferen entfärben sie; Typhusbaz., Bact. coli und die meisten sonstigen, den Ruhrbaz. ähnl. Mikrobien färben den Nährboden rot, einige auch blau, bilden teilweise Gas. Eine (entsprechend hergestellte) Lösung von 10 Nutrose, 5 NaCl, 50 Lackmuslösung, 20 Mannit auf 1000 Aq. lassen Ruhrbaz. beim Wachstum unverändert, andere Baz. färben sie rot oder blau, erzeugen Gas (im Gärröhrchen S. 29) oder Koagulation.
7. Agglutination durch Serum mit Ruhrbaz. immunisierter Tiere (Methodik der Immunisierung s. S. 110, Prüfung wie bei Typhusbaz. S. 71. Immunisierung von Tieren schwer, am geeignetsten Hammel und Ziegen.)
8. Ferner Unterscheidung von Typhusbaz. gemäss S. 67 Nr. 10.

B. Flexnerscher Typus.

Verhalten wie Typus A, rötet aber Lackmus-Mannit Agar (s. oben 6) in 24—48 Stdn., rötet Lackmus-Mannit-Nutrose-

lösung (s. oben 6) in 24 Stdn., koaguliert sie in 48 Stdn. bildet in Peptonwasser nach einigen Tagen Indol. Ausserdem Agglutination nur durch spezifisches Serum, nicht durch das gegen Typus A wirksame (s. oben 7), wenn auch eine gewisse Artverwandtschaft in Gestalt von Mitagglutination zum Ausdruck kommt (vgl. „Gruppenreaktion" S. 78 unter c, — wie dort angegeben Wirkungsgrenze des Serums feststellen)!

Agglutination mit Serum Kranker erst bei 1 : 100 und mehr beweisend. Immunisierung von Tieren, auch Kaninchen, gelingt leicht.

Neben diesen beiden Typen kommen atypische, in einzelnen Eigenschaften abweichende Stämme vor (vgl. z. B. Kruse, D. m. W. 07 Nr. 8/9).

11. Bacillus (oder Bacterium) coli.

Die typischen Vertreter dieser Bakterien gruppe sind etwas beweglich, besitzen 4—12 seitliche Geisseln, bilden auf Gelatine oberfl. kräftige häutchenart. Beläge und tiefe runde bräunl. Kolonien, ohne zu verflüssigen, auf Kartoffeln starke graugelbliche Rasen, vergären Traubenzucker stark, bilden Indol, kein Proteinochrom, koagulieren Milch, produzieren in Lackmusmolke stark und dauernd Säure. Es kommen Varietäten vor, denen eine oder mehrere dieser Eigenschaften mangeln; doch verflüssigt keine Abart Gelatine. Unterscheidung von Typhusbaz. s. S. 67 ff., vom Ruhrbaz. S. 80. Nach Gram nicht färbbar. Für Meerschw. bei intraperitonealer Injektion pathogen (Peritonitis, Septikämie), bisweilen auch für diese Tiere und für Mäuse bei subkutaner Impfung (Eiterung, Septikämie). Agglutination durch spezif. Immunserum analog S. 71, doch wirkt ein Immunserum nicht allen Stämmen gegenüber, sondern nur auf den immunisierenden und ev. einige andere.

12. Choleravibrionen.

Kulturen auf den gewöhnlichen Nährsubstraten erhältlich. Etwas alkalische Reaktion ist vorteilhaft. Eigenartiges Wachstum auf Gelatine (helle „Glasbröckchen"-Kolonien auf der Platte, klare „luftblasenartige" Verflüssigung an der Oberfläche in der Stichkultur; doch kommen auch atypische, dunkel gelblich gefärbte Kolonien mit gefasertem Rand allein oder zwischen typischen Kolonien vor). Auf Agar bläuliche durchscheinende Kolonien. Reichliches Wachstum in Peptonwasser (s. S. 14), auf Kartoffeln nur, wenn sie mit Soda-

lösung (1 % ig) oder Salzwasser (s. S. 17 Abs. 6) gekocht sind. Eine endständige Geissel. Bewegung schliessend, „mückenschwarmartig“. Keine Sporen. Kulturen geben Nitrosoindolreaktion (s. S. 31), keine Phosphoreszenz (s. S. 31).

Färbung am schönsten mit Fuchsinlösungen; bei Anwendung der Gramschen Methode tritt Entfärbung ein.

Differentialdiagnose von Cholera- und ähnlichen Vibrionen ist oft schon mit Hilfe der Gelatineplattenkultur und bei Berücksichtigung von Nitrosoindolreaktion und Phosphoreszenz möglich, ganz sicher aber meist nur unter Benutzung der Serumreaktion in Form des Pfeifferschen Versuchs oder der Agglutination — s. S. 85 ff.

Die bakteriol. Diagnose einer Ch.-Erkrankung beim Menschen. (Vgl. Anweis. des Bundesrats zur Bekämpfung der Cholera, Berlin, Rich. Schoetz 1905, 0,60 M. Anl. 7, u. Deckblätter dazu von 1907, auch Gaffky, Klin. Jahrb. Bd. 16, S. 323).

Zur Untersuchung dient eine Stuhlprobe oder der Inhalt einer Darmschlinge aus dem mittleren oder unteren Teile des Ileum. Ausbreiten des Materials in einer grossen Glasdoppelschale. Heraussuchen von „Schleimflöckchen“ zur Untersuchung. Bei festen Stühlen Erweichen mit sterilem Wasser zur Auffindung der Flöckchen.

I. Untersuchungsmethoden.

1. Mikroskopische Untersuchung

a) von Ausstrichpräparaten (wenn möglich von Schleimflocken). Färbung mit verdünnter Karbolfuchsinlösung (1 : 9 Aq.)

b) im hängenden Tropfen, anzulegen mit Peptonlösung (s. S. 14), sofort und nach $^1/_2$ Std. Verweilen bei 37° frisch und gefärbt zu untersuchen.

2. Gelatineplatten. Menge der Aussaat 1 Öse (womöglich von einer Schleimflocke), Verdünnungen zu je 3 Ösen. 2 Serien zu je 3 Platten anlegen. Nach 18 Std. Verweilen bei 22° mit schwacher Vergrösserung untersuchen, Klatsch-, ev. Ausstrichpräparate und Reinkulturen herstellen.

Die Gelatine soll aus Fleischwasser mit 1 % Pepton, $^1/_2$ % Kochsalz, 10 % Gelatine bestehen und nach Neutralisierung auf Lackmus (s. S. 9 Nr. 3) 3 % einer 10 % igen Lösung kristallisierter Soda zugesetzt erhalten haben. (Alkalialbuminatgelatine s. S. 86).

3. Agarplatten. Ausstreichen einer Öse Materials auf der Oberfläche von 3 Agarplatten nacheinander; oder

Verteilen einer Öse Materials in 5 ccm Peptonwasser und hiervon 1 Öse auf 1 Platte ausstreichen. Nach 12—18-stündiger Bebrütung bei 37° untersuchen wie zu 2.

Das Agar soll aus Fleischwasser + 1% Pepton, ½% NaCl, 3% Agar bestehen und wie die Gelatine alkalisiert sein. Die Platten müssen vor der Beimpfung ½ Std. bei 37° im Brutschrank mit der Fläche nach unten offen gehalten werden.

4. Anreicherung mit Peptonlösung (s. S. 14).

a) in 6 Röhrchen von je 10 ccm Inhalt je 1 Öse Material aussäen. Nach 6, 12 u. 24 Std. Verweilen bei 37° mikroskopisch Proben von der Oberfläche untersuchen — Röhrchen nicht schütteln! Von dem Röhrchen, das dabei am meisten verdächtig ist, Ch. vibr. zu enthalten, werden weiterhin 3 Peptonwasserröhrchen mit je 1 Öse beimpft und je eine Serie Gelatine- und Agarplatten angelegt. Die Peptonwasserröhrchen sind vor der Impfung im Brutschrank bei 37° vorzuwärmen.

b) in ein Kölbchen mit 50 ccm Peptonlösung ca. 1 ccm Kot aussäen, bebrüten und untersuchen wie zu a.

5. Anlegen von Reinkulturen. Am besten von den Agarplatten aus: Gelatinestich-, Agarstrichkulturen.

6. Prüfung der Reinkulturen.

a) durch Feststellung der Agglutinationsfähigkeit s. S. 85,

b) durch den Pfeifferschen Versuch s. S. 86.

II. Gang der Untersuchung.

1. In ersten Fällen (d. h. wenn noch kein Ch.-fall am Orte festgestellt ist) sind sämtliche Methoden anzuwenden und zwar in folg. Reihenfolge: a) Impfung von 6 Peptonwasserröhrchen, b) Herstellung der mikroskop. Präparate, c) Anfertigung von je 2 Serien Gel.- und Agarplatten, d) Untersuchung der mikroskop. Präp., e) Herstellung von Reinkulturen, f) Prüfung dieser gemäss I 6a und b.

2. In folgenden Fällen (d. h. nachdem bereits das Vorhandensein von Ch. am Orte festgestellt ist) wird wie bei II 1 verfahren, jedoch sind nur 3 Röhrchen Peptonwasser und nur je eine Serie Gel. und Agarplatten anzulegen, auch statt Agarplatten ev. Röhrchen mit schräg erstarrtem Agar zu beimpfen. Ev. Gel.-platten ganz fortlassen, da Agar schneller zum Ziel führt. Bei f) genügt I 6 a im hängenden Tropfen.

3. Bei Ansteckungsverdächtigen („Evakuierten") und bei Genesenen: Die mikroskop. Untersuchung fällt fort, falls die Ausleerungen nicht choleraartig sind. Statt der Peptonröhrchen 1 Peptonkölbchen (s. I. 4 b). Von diesem nach 6—12 Std. Bebrütung Anlegen je 1 Serie Gel.- u. Agarplatten. Prüfung der verdächt. Kol. nach I 6 a.

4. Wasseruntersuchung. Mindestens 1 Liter des Wassers wird mit 10 % konzentrierter Peptonwasserlösung (s. S. 14) versetzt und gründlich durchgeschüttelt, dann zu je ca. 100 ccm in Kölbchen verteilt und nach 8- und 18 stünd. Bebrüten bei 37° in der Weise untersucht, dass Tröpfchen von der Oberfläche zu häng. Tropfen und gefärbten Präp. verarbeitet werden und dass von dem Kolben, an dessen Oberfläche sich mikroskopisch die meisten Vibr. finden, Peptonwasserröhrchen besät, Gel.- u. Agarplatten angelegt und wie bei II 1 weiter untersucht werden. Prüfung der Reinkulturen nach I 6 a und b.

III. Beurteilung des Befundes.

Zu II 1. Die Diagnose Cholera ist als sicher erst anzusehen, wenn sämtliche Methoden ein positives Ergebnis haben; wichtig sind namentlich I 6 a und b. Ergibt die mikroskop. Untersuchung Vibrionen in der charakter. Anordnung (Lagerung in Zügen wie schwimmende Fische im gefärbten Präparat) fast in Reinkultur und die Gelatineplatte Kol. von typischem Aussehen, so kann die vorläufige Diagnose Ch. gestellt werden, vor Abgabe der endgültigen Diagnose ist aber das Ergebnis der ganzen Untersuchung abzuwarten. Gibt die Agglutination verdächtiger Kolonien im hängenden Tropfen („orientierende Agglutinationsprobe") nicht absolut einwandfreie Resultate, so ist die quantitative Bestimmung der Agglut. vorzunehmen, sobald Reinkultur gewonnen ist (vgl. S. 85).

Zu II 2. Ch. kann diagnostiziert werden bei positivem Ausfall der mikroskop. Untersuch., charakteristischem Wachstum in den Gelatine- und Agarplatten und positivem Ausfall der Agglutination im hängenden Tropfen.

Zu II 3. Bei Ansteckungsverdächtigen ist Ch. auszuschliessen, wenn bei 2, durch 1 Tag voneinander getrennten Fäcesuntersuch. keine Ch.-vibr. gefunden werden. Ebenso bei Krankheitsverdächtigen; doch hat bei schwerem Verdacht eine dritte Untersuchung stattzufinden. Genesene sind als

nicht mehr ansteckungsfähig anzusehen, wenn die Untersuch. an 3 durch je 1 Tag getrennten Tagen negativ ausfällt.

Zu II 4. Wasservibrionen sind als Ch. vibr. anzusehen, wenn die Agglutinierbarkeit eine entsprech. Höhe hat (s. unten) und der Pfeiffersche Versuch positiv ausgefallen ist.

IV. Feststellung abgelaufener Cholerafälle.

Abgelaufene Ch.-verdächtige Fälle lassen sich feststellen durch Untersuchung des Blutserums. Entnahme von Blut mittelst Schröpfkopfes (s. S. 89), wobei mindestens 1 ccm Serum zu gewinnen ist. Verdünnung mit 0,8 %iger Kochsalzlösung bezw. Bouillon, Prüfung auf Agglutination mit frischer Ch.-kultur und Pfeifferscher Versuch. (S. auch S. 86 Abs. 5.) Letzterer auch nach Aufhören der Agglutination oft noch positiv!

Agglutinationsversuch. (Geeignetes Serum vom Inst. f. Infekt.-Krankheiten zu Berlin erhältlich).

a) Im hängenden Tropfen bei schwacher Vergrösserung. Das spezif. Serum muss mit 0,8 %iger NaCl-Lösung gemischt in 2 verschiedenen Konzentrationen (d. h. unterste Wirksamkeitsgrenze gegenüber Test.-Kultur und 5faches Multiplum) sofort, spätestens aber nach 20 Min. bei 37° deutliche Häufchenbildung der Vibr. geben. Zur Kontrolle ein Präparat mit 10 mal so starker Konzentration von normalem Serum derselben Tierart, von der das spezif. Serum stammt; in diesem Präparat darf Agglutination nicht eintreten. — Unter 15 Stdn. alte Agarkulturen können mit der NaCl-Lösung Pseudoagglutin. geben infolge schwerer Verreibbarkeit, einzelne Stämme neigen auch noch später dazu. Dann Pfeifferscher Versuch entscheidend! —

b) Quantitative Bestimmung der Agglutinierbarkeit. Verdünnungen des spezif. Serums mit ganz klarer (zweimal durch gehärtete Filter geschickter) 0,8 %iger NaCllösung 1 : 50, 1 : 100, 1 : 500, 1 : 1000, 1 : 2000. In je 1 ccm dieser Verdünnungen im Röhrchen (wie S. 71 b α) 1 Öse Agarkultur verreiben und durch Schütteln gleichmässig verteilen. Nach 1 Std. Verweilen bei 37° in reflekt. Tageslicht mit der Lupe betrachten (vgl. S. 72). Nur unzweifelhafte Häufchenbildung ist als positiv zu rechnen; Agglutin. soll in regelmässiger Stufenfolge bis annähernd zur Titergrenze eintreten. Bei jeder Unters. zur Kontrolle: 1. Normales

Serum derselben Tierart, von der das spezif. Serum stammt, aber 10fach stärker konzentriert + Kultur; 2. die 0,8 %ige NaCl-Lösung allein + Kultur; 3. sichere Ch -Kultur von gleichem Alter wie die zu untersuchende Kultur + Verdünnungen des spezif. Serums.

Pfeifferscher Versuch. (Geeign. Serum (Kaninchen) v. Inst. f. Infekt.-Krankheiten zu Berlin erhältlich; es soll mindestens einen Titer von 0,0002 mg besitzen, d. h. soviel Serum muss genügen, um die Vibr. in 1 Öse = 2 mg 18 stünd. Ch.-Kultur konstanter Virulenz bei Injektion mit 1 ccm Nährbouillon in der Bauchhöhle des Meerschweinchens binnen 1 Std. unter Körnchenbildung zur Auflösung zu bringen.)

4 Meerschweinchen A—D von je 200 g Gewicht werden geimpft. A—C erhalten je 1 Öse der zu untersuchenden, 18 Stdn. bei 37° auf Agar gezüchteten Kultur in 1 ccm Bouillon in die Bauchhöhle injiziert (s. S. 108) und zwar A gemischt mit der fünffachen Titerdosis (also 0,001) des spez. Serums, B gemischt mit der zehnfachen Titerdosis (also 0,002) des spezif. Serums, C (Kontrolltier) gemischt mit dem fünfzigfachen Multiplum der Titerdosis (also 0,01) normalen Serums derselben Tierart, von der das spezif. Serum stammt. D erhält 1 Öse der zu untersuch. Kultur zur Prüfung ihrer Virulenz intraperitoneal.

Hängende Tropfen vom Bauchhöhleninhalt sofort, nach 20 u. 60 Min. (Entnahme vgl. S. 69 α). Bei A u. B ist, wenn die Kultur Ch. ist, nach spätestens 60 Min. Auflösung der Vibr. erfolgt, bei C und D finden sich zahlreiche lebhaft bewegliche oder wohl erhaltene Vibrionen.

Für IV (abgelauf. Cholerafälle) gilt folgende Methodik: Verdünnung des Menschenserums mit 20, 100 u. 500 Teilen Bouillon; je 1 ccm davon mit je 1 Öse (2 mg) 18 stünd. Agarkultur virul. Ch. vibr. je 1 Meerschw. v. 200 g in die Bauchhöhle injizieren. Falls nach 20 oder 60 Min. Bakteriolyse sichtbar, ist überstandene Ch. anzunehmen. Ein Kontrollmeerschw. von 200 g erhält intraper. 1 Öse der Kultur ohne Serum in 1 ccm Bouillon.

[Sehr charakteristisches Wachstum zeigen die Chv. auf Alkalialbuminatgelatine (Deycke). Alkalialbuminat von E. Merck-Darmstadt (100 g = 11 Mk.) zu beziehen oder folgendermassen herzustellen: 1 kg feingehacktes fettfreies Kalbfleisch 48 Std. mit 1200 ccm 3 %iger KOH bei 37°, dann einige Stunden bei 60—70° halten. Saft abfiltrieren

und mit verdünnter HCl versetzen, bis keine Fällung mehr entsteht. Den abfiltrierten Niederschlag in soviel konzentr. Sodalösung, dass die Lösung schwach alkal. wird, im Dampfstrom lösen. Lösung eindampfen, Rückstand bei 100° zu Pulver trocknen. 2—3 g dieses Pulvers oder des käufl. A. verarbeite mit 1 g Pepton, 1 g NaCl, 10—15 g Gel. und 100 g Aq. comm. zu Nährgelatine. Neutralisieren mit HCl, alkalisieren mit $^2/_3$ % kristall. Soda.]

13. Bacillus der Bubonenpest.

Vgl. Anweisung des Bundesrats zur Bekämpfung der Pest, Berlin 1905, Rich. Schötz, 0,60 M., Anl. 7. Das Vorrätighalten von lebenden Pestkulturen, sowie wissenschaftliche Untersuchungen und Tierversuche mit ihnen sind in Deutschland auf bestimmte, besonders eingerichtete Laboratorien beschränkt: in der Praxis sind nur kulturelle Untersuchungen zur Feststellung der Diagnose bei pestverdächt. Fällen erlaubt.

Als Untersuchungsmaterial bei Pestverdacht kommt hauptsächlich Bubonensaft oder -eiter (durch Spritze oder Inzision gewonnen), Blut, Sputum und Rachensekret in Betracht. Färbung mit den gewöhnlichen Lösungen. Zur Polfärbung Trockenpräparat 25 Min. in Alkohol absol. fixieren (besser noch Alkohol absol. auftropfen u. nach 1 Min. Rest durch Erwärmen entfernen) und färben (dünne wässerige Methylenblaulösung am besten). Züchtung auf Agar, Blutserum, Gelatine (schwach alkal.; für unreines Material Gel. am besten). In 1. Gen. ziemlich langsames Wachstum (48 Std. u. mehr, bis deutliche Kolonien entstehen). Unbewegl. kleine Baz., nach Gram entfärbt, auf Agar mit 3 % NaCl-Gehalt kugel- und hefeähnliche Formen, in Bouillon Ketten bildend, Zucker nicht vergärend, Gelatine nicht verflüssigend. Pathogen für Ratten, Meerschweinchen und andere Tiere bei jeder Infektionsart; besonders charakteristisch ist Infektion beim Einreiben auf die rasierte Haut des Meerschw. Agglutinierbar durch Serum von immunisierten Tieren und Pestrekonvaleszenten.

14. Tetanusbazillen.

Beweglich durch peritriche Geisseln. Wachstum nur unter Sauerstoffabschluss. Um Reinkulturen aus dem Eiter an der Infektionsstelle bei Tetanuskranken (nur dort finden sich im Körper die Baz.) zu erhalten, besät man Bouillonröhrchen mit ihm, leitet Wasserstoff durch [nach S. 26 4. a)]

und hält bei Brüttemperatur. Nach 24 Stunden, noch sicherer nach 48 Stunden, haben die Tetanusbazillen Sporen gebildet, wovon man sich durch Präparate überzeugt. Werden die Kulturen darauf 3/4—1 Stunde im Wasserbade auf 80° erwärmt, so bleiben (wenn nicht zugleich auch sehr resistente Sporen anderer Bakterien vorhanden sind) nur die Tetanussporen lebendig; durch anaërobes Plattenverfahren kann man isolierte Kolonien und Reinkulturen von ihnen erhalten. Züchtung aus Erde etc.: Mäuse oder Meerschw. subkutan infizieren, aus dem Eiter an der Impfstelle der unter Tetanuserscheinungen in einigen Tagen gestorbenen Tiere Kulturen wie vorbeschrieben anlegen. Wachstum auch bei Zimmertemperatur, Gelatine verflüssigend.

Färbung mit den üblichen Anilinfarben, auch nach Gram. Sporen (Köpfchenformen) färbbar nach S. 48—49.

15. Bacillus pyocyaneus.

Auf allen üblichen Substraten züchtbar. Typische Stämme bilden tiefgrünen, in Chloroform löslichen, allmählich braun werdenden Farbstoff (Pyocyanin), der den ähnlichen fluoreszierenden Bazillen fehlt. Pathogen für Kaninchen, Meerschweinchen und Mäuse. Nach Gram nicht färbbar.

16. Pyogene Staphylo- und Streptokokken.

Kulturen auf den gewöhnlichen Substraten zu erzielen. Bestes Wachstum bei Körperwärme. Staph. aureus und albus verflüssigen Gelatine, Streptok. und Tetragenus nicht. Alle 4 nach Gram färbbar. Streptok.-Ketten am schönsten in flüssigen Substraten (auch Agarkondenswasser.)

Blutuntersuchung bei Septikämie u. Pyämie: Blutentnahme aus der Vena mediana mit der Spritze (s. S. 101). Sofort Aussaat in 6 Röhrchen verflüss. Agar von etwa 42°, in jedes 2—3 ccm Blut. Ausgiessen zu Platten, die umgekehrt stehend 1—4 Tage bei 37° bebrütet werden. Es zeigen

Streptok. pyogenes seu erysipelatis kleine helle Kol. mit hellem Hof (Hämolyse).

Streptok. mitis seu viridans (seltener Befund); sehr kleine grünliche Kol. Trübt Traubenzuckeragar. Schwach tierpathogen.

Streptok. mucosus sehr zarte grüne, deutlich schleimige Kol. (seltener Befund, mehrfach bei Pneumonie gefunden). Hoch tierpathogen.

Staph. pyogenes üppige Kol. mit hellem Hof.

Gonokokken kleine schwärzl. Kol.

Pneumokokken desgleichen.

17. Pneumokokken.

Reinkulturen am leichtesten zu gewinnen durch subkutane oder intraperitoneale Impfung von Mäusen oder Kaninchen mit pneumonischem Sputum und Aussaat von Blut der an sog. „Sputumseptikämie" nach ca. 48 Stdn. gestorbenen Tiere auf Agar oder Serum. Auch aus Mundspeichel vieler gesunder Menschen sind Kulturen auf die gleiche Weise zu gewinnen. Wachstum am besten bei Körpertemperatur (als feine Tautröpfchen), nicht unter 20°. Kulturen alle 6—8 Tage umzüchten, weil sie oft schnell absterben. In Blut — s. S. 23 oben — erhalten sich die Pneumok. jedoch monatelang lebend.

Die (A. Fränkelschen) Pneumokokken, auch mit den gewöhnlichen Methoden tingierbar, färben sich nach Gram, die (Friedländerschen) Pneumobazillen nicht. Letztere wachsen bei gewöhnlicher Temperatur im Gelatinestich in nagelförmiger Kultur, auf Agar als schleimige glasig-weisse Auflagerung. Sie sind grösser als die Pneumokokken, haben Bazillenform, erzeugen bei Mäusen subkutan verimpft ebenfalls Septikämie. Kapselfärbung bei beiden in Präparaten aus dem Körper möglich. (Methoden S. 47.)

Pneumok. unterscheiden sich von manchen pyogenen Streptok. nur durch ihre Kerzenflammenform, ihre Neigung zur Bildung von Diplok. mit Kapseln im Tierkörper, die Bildung von sehr kurzen Ketten in flüssigen Medien. S. auch S. 88 unter 16.

18. Meningokokken.

(Kokken der epidem. Cerebrospinal-Meningitis.)

Wachstum nur bei mehr als 25° gut. Zur Züchtung aus dem Körper (Gehirneiter, Cerebrospinalflüss., Nasen- und Nasenrachenschleim s. S. 102) am besten Ascitesagar (auch Serumagar, Blutagar, s. S. 16 u. 101, sowie Loefflerserum, s. S. 15), zur Fortzüchtung in späteren Generationen auch Agar. In Bouillon Trübung und Häutchen. Erste Generation

zart, spätere üppiger. Kulturen feucht halten und im 37° Brutschrank bewahren, weil sonst Lebensfähigkeit oft schnell erlischt. Anfangs täglich, später alle 5—7 Tage umzüchten. Färbung besonders gut nach dem Verfahren S. 92 Nr. 2. Nach Gram nicht darstellbar. Form ähnlich den Gonokokken; meist wie diese als Diplokokken, in Zellen eingeschlossen. Für Tiere (Mäuse und Meerschw.) schwach pathogen (toxisch) vom Peritoneum aus. — Blutserum Erkrankter agglutiniert in der Regel (über 1 : 50 beweisend). Zur Diagnose von Kulturen Agglutination mit dem Serum immunisierter Tiere.

Der in Nase und Rachen vorkommende Mikrok. katarrhalis ist dem Meningok. in der Form ähnlich, ebenfalls nach Gram nicht darstellbar, wächst aber auf gewöhnlichem Agar gut, auch auf Gelatine (ohne Verflüssigung) und ist vor allem, wie andere ähnliche Kokken, durch den Agglutinationsversuch zu unterscheiden.

19. Gonokokken.

Kulturen gelingen nicht auf den gewöhnlichen Nährböden, wenigstens nicht in erster Generation, bisweilen aber Fortzüchtung wenig anspruchsvoller G.-Stämme in späteren Generationen. Man benutzt folgende Substrate, auf denen die G. als feine tautropfenähnliche Kolonien bei 36° (zweckmässig die Temperatur nicht höher nehmen!) wachsen:

1. Erstarrtes Menschenblutserum nach Bumm. Nach Unterbindung der Nabelschnur bei der Geburt wie gewöhnlich mit doppelter Ligatur und Durchtrennung dazwischen wird das placentare Ende desinfiziert und oberhalb der Unterbindung durchschnitten. Bei jeder Wehe und bei Druck auf den Uterus entleert sich Blut, das in sterilem Gefässe aufgefangen und wie Tierblut (s. S. 14) weiter verarbeitet wird. Auch kann man die schon geborene Placenta manuell exprimieren. Fraktionierte Aussaat des G.-haltigen Eiters. Kulturen nicht üppig.

2. Menschenblutserum-Agarmischung nach Wertheim. Man besät ein auf ca. 40° erwärmtes, etwa 1 ccm flüssiges Menschenblutserum (Gewinnung wie bei 1.) enthaltendes Röhrchen mit dem G.-haltigen Material und legt Verdünnungen davon in zwei gleich warmen anderen Röhrchen mit demselben Substrat an. Dann mischt man den Inhalt eines jeden mit je 2 ccm verflüssigten, auf etwas über 40° abgekühlten Nähragars, giesst die Mischung schnell in Schälchen,

lässt erstarren und bebrütet. Besser noch ist Ausstrich auf der Oberfläche des erstarrten Nährbodens. Kolonien grösser als bei 1.

3. Ascitesagar nach Kiefer. Neutrales Fleischwasseragar mit einem Gehalt von 3,5 % Agar, 5 % Pepton, 2 % Glyzerin, 0,5 % NaCl wird verflüssigt, dann auf 50° abgekühlt und mit ebenso warmer Ascitesflüssigkeit āā gemischt in Petrischalen gegossen oder in Röhrchen schräg erstarrt. Besäung in fraktionierter Aussaat. Ist die Ascitesflüssigkeit sehr alkalisch, so mischt man sie mit nicht neutralisierter, resp. so stark angesäuerter Agarlösung, dass die Mischung leicht alkalisch ist.

4. Blutbestrichenes Agar nach Abel. Man säe aus auf Nähragar, das man mit etwas Blut aus einer desinfizierten und gut vom Desinfiziens mit sterilem Wasser und steriler Watte wieder befreiten Hautstelle des Patienten oder einer anderen Person bestrichen hat. Erste Generation geht nicht immer an; wegen der einfachen Herstellung zur Fortzüchtung empfehlenswert.

5. Nutrose-Nährboden nach Wassermann. Mische im Kolben 15 ccm Schweineblutserum, 30—40 ccm Wasser, 2—3 ccm Glyzerin, 0,8 g Nutrose, koche unter beständigem Schütteln 15 Min. Wiederhole Kochung (Schütteln!) am folgenden Tage 15 Min. Die Flüssigkeit wird vorrätig gehalten, zum Gebrauch auf 50—60° erwärmt, mit 2 %igem Peptonagar von gleicher Temp. āā gemischt in Schälchen gegossen und fraktioniert besät. Besonders für Fortzüchtung empfehlenswert.

Zur Prüfung, ob die gewachsenen Kol. wirklich aus G. bestehen, mache man

α) Präparate mit gewöhnlicher und Gramscher Färbung. (G. entfärben sich bei Gram im Gegensatz zu den meisten anderen Kokken — s. aber 18 S. 89!)

β) Abimpfungen auf gewöhnliches Agar. Handelt es sich um G., so bleibt hier das Wachstum aus (wenigstens bei frisch isolierten Stämmen, s. ersten Satz dieses Kapitels).

γ) Verimpfungen auf Tiere (Mäuse, Kaninchen. G. nur in massiven Dosen toxisch wirkend).

Färbung der Gonokokken in Eiter- etc. Präparaten (Diplokokkenformen, Lagerung sehr vielfach in Eiterzellen!) mit den gewöhnlichen Anilinfarben oder, zwecks Erzielung einer Kontrastfärbung zu den Gewebselementen, auch nach folgenden Methoden:

43

1. Mit den S. 42 sub II u. III. angegebenen Methylenblaueosinlösungen. G. und Zellkerne blau, übriges Gewebe rot.
2. Nach Loeffler (D. m. W. 07 Nr. 5):
   1. Fixieren der Ausstriche in Alkohol absol. + Äther āā.
   2. Färben m. d. Lösung 1 S. 64 Abs. 2 unter Erwärmen.
   3. Abspülen in Wasser.
   4. Entfärben mit Alkohol absol. 177 + 1‰iger wässer. Bromeosin B extra Höchst-Lösung 20 + Acid. acet. 3.
   5. Abspülen in Wasser. G. dunkelblau, Kerne blassblau, Zellen blassrosa.
3. Nach Giemsa (s. S. 97).
4. Nach A. Neisser:
   1. Färbung in gesätt. alkohol. Eosinlösung unter Erwärmen einige Minuten.
   2. Absaugen des Eosins mit Fliesspapier und sofort
   3. Aufbringen von gesätt. alkohol. Methylenblaulösung (1/4 Min.!)
   4. Abspülen in Wasser.
   Gonokokken und Zellkerne blau, Zellleiber rot.
5. Nach Pappenheim: Färbung für 1 Min. mit einer Lösung von ca. 2 Federmesserspitzen Methylgrün und ca. 1/2 Federmesserspitze Pyronin (Grübler-Leipzig) in 5 ccm Aq. dest. (Lösung soll blauviolett sein, beste Mischung ausprobieren!), Abspülen in Wasser. G. rot, Kerne blau.

G. arme Sekrete (alte Gonorrhöen) auf Objektträger ausstreichen (S. 36), färben nach Gram (G. nehmen Gegenfarbe an — cave jedes Abspülen in Wasser dabei bis nach der Entfärbung mit Alkohol). Wiederholt untersuchen!

20. Aktinomyces.

Kulturen auf den üblichen Nährböden, bes. Glyzerinagar zu erzielen. Viele Kulturen anlegen, auch anaërob, da manche Stämme (Arten?) nur bei Luftabschluss angehen. Wachstum in erster Generation meist langsam, in späteren üppig. Trockene, fest am Nährboden haftende, in diesen sich „einfressende“ Kolonien, später kalkweiss oder gelb pulverig bestreut aussehend. Wachstum auch in Gelatine bei Zimmertemperatur, dieses und Serum (stets?) verflüssigend. (In Kulturen keine Keulen!) Die Drusen im Eiter kann man zwecks leichterer Aussaat im sterilen Achatmörser zunächst verreiben.

Färbung nach den gewöhnlichen einfachen Methoden möglich, aber in den Schnitten die Pilze nicht sehr gut darstellend; besser sind Kontrastfärbungen:

a) nach Gram (s. S. 43). Schnitte 24 Stunden färben. Nach Loeffler lege man die Präparate vorher einige Minuten in 0,01 %ige Kalilauge). Dann 15 Minuten in die Jodlösung. Nachfärben mit Eosin und Vesuvin,

b) nach Weigert (s. S. 46),

c) nach Weigert mit Orseille. 1. Färbung in dunkelroter Lösung von Orseille in 20,0 Alkohol absol., 5,0 Acid. acetic., 40,0 Aq. destill. 1 Std. bis 24 Stdn. 2. Abspülen in Wasser. 3. Färbung in wässeriger 1 %iger Gentianaviolettlösung. 4. Aufhellen in Zedernöl usw. — Zellkerne blauviolett, Gewebe orange, die Aktinomycesdrusen innen verwaschen blau, aussen rubinrot, dazwischen oft eine farblose Zone. — NB. Die Orseille lasse man zur Befreiung von Ammoniak vor dem Gebrauch einige Zeit an der Luft liegen.

d) nach Israel. 1. Färben der Schnitte mehrere Stunden in einer konzentrierten Lösung von Orcein in Wasser, das mit Essigsäure angesäuert ist. 2. Abspülen in Wasser. Dann auf den Spatel nehmen, Wasser mit Fliesspapier abtupfen und 3. für einige Sekunden in Alkohol. absol. 4. Schnell auf den Objektträger, Abtrocknen durch Aufdrücken von Fliesspapier. Lufttrocken werden lassen. 5. Einlegen. Will man nur die Pilze, nicht auch das Gewebe gefärbt haben, so kann man den Alkohol länger einwirken lassen. Färbungsresultat ähnlich wie bei c.

e) nach Boström. 1. Färbung in Anilinwassergentianaviolett. 2. Übertragung ohne Abspülen in Pikrokarmin (n. Weigert s. S. 47). 3. Auswaschen in Wasser. 4. Entfärben in Alkohol absol., bis die Schitte rotgelb sind. 5. Aufhellen in Zedernöl usw. — Drusenzentrum blassblau, Keulen rot, Gewebe gelbrot.

21. Hefen und Soor.

Kultur auf schwach sauren zuckerhaltigen Nährböden; bes. gut sterilisierte Bierwürze oder Backpflaumenabkochung oder Traubenmost + Agar oder Leitungswasser-Gelatine, ohne weiteren Zusatz. Isolierung im Plattenverfahren (S. 19 ff.) oder durch Anlage von Ein-Zell-Kulturen: Starke Verdünnung in Gelatine, Anlage eines hängenden Tropfens, Untersuchung

mit schwacher Vergrösserung, Bezeichnung der Stellen, wo isolierte Zellen liegen, durch Tintenpunkt auf der Deckglasoberseite, Abimpfung von den an diesen Stellen erwachsenen Kolonien.

Färbungen mit den gewöhnlichen Anilinfarben.

Färbung der Sporen mit Karbolfuchsin unter Kochen, dann Abspülen in 4 %iger Schwefelsäure und Gegenfärbung der Zellsubstanz mit Methylenblaulösung.

Färbung der Kerne nach Möller: 1. Einlegen der Präparate mindestens 2 Stunden in 3—4 %ige Lösung von schwefelsaurem Eisenoxyd-Ammoniak. 2. Abspülen in Wasser. 3. Färbung 1/2 Stunde in gesättigter Lösung von Hämatoxylin in Brunnenwasser. 4. Auswaschen in Wasser. 5. Differenzieren in der Lösung 1 für 1/2 bis 2 Min. bei beständiger Kontrolle unter dem Mikroskop. 6. Abspülen in Wasser. Lufttrocken werden lassen. Kanadabalsam.

Darstellung von Hefen im Körpergewebe nach O. Busse: 1. Färben mit Hämateinlösung 15 Min., 2. Spülen in Wasser 5 Min., 3. Färben mit Karbolfuchsin Ziehl (S. 41) 1 : 20 Aq. 1/2—24 Std., 4. Differenzieren in 60 %igem Alkohol, absol. Alkohol, Zedernöl usw. Gewebskerne blau, Hefen (nicht alle!) leuchtend hellrot.

22. Schimmelpilze und andere Pilze.

Zur Kultur der Schimmelpilze benutzt man die üblichen Bakteriennährböden, besonders saure, Brotbrei (S. 17) und die unter Nr. 21 S. 93 für Hefenzüchtung genannten Substrate. Von den gewöhnlichsten Schimmelpilzen wachsen die Penizillien meist nur bei Zimmertemperatur, einige Aspergillus- und Mucorarten bei Körpertemperatur; z. T. sind diese für Kaninchen bei intravenöser Injektion pathogen.

Zur mikroskopischen Untersuchung bringt man womöglich zunächst den Pilz mit dem ihn tragenden Substrat unter das Mikroskop bei schwacher Vergrösserung, dann Teile des Pilzes zwischen Deckglas und Objektträger ohne Wasserzusatz. Will man in Luft gewachsene Pilze in Flüss. untersuchen, so nimmt man nicht Wasser, das sie schlecht benetzt, sondern befeuchtet sie mit folgender Mischung: Alkohol u. Liq. Ammon. caust. āā 25,0, Glyzerin 15,0, Aq. dest. 35,0 (ev. Gelatine 1,0, — diese zuerst im Wasser unter Erwärmen lösen). Zur Konservierung Deckglas mit Lackrand umziehen.

Auch in die S. 113 angegebenen Glyzeringelatine kann man die Präparate einlegen.

Zur Färbung der Schimmelpilze benutzt man basische Anilinfarben, zur Färbung in Schnitten z. B. die Loefflersche Methylenblaulösung (s. S. 40).

Die **Hautparasiten** (Favus-, Trichophytiepilze usw.) lassen sich auf Gelatine und Agar kultivieren und wie Bakterien färben. Zur Isolierung zweckmässig Verreibung der Borken, Haare etc. mit ausgeglühter, erkalteter Infusorienerde im sterilen Mörser, Anlage von Platten, Abimpfung von Kol., die, wie das Mikroskop zeigt, nachweislich aus einer Spore erwachsen sind. Ev. Einlegen des Untersuchungsmateriales vor der Aussaat in 50%igen oder stärkeren, bis absoluten Alkohol für 1—24 Stdn. Dabei sterben die Bakterien sämtlich oder grossenteils ab, während die Pilze meist überleben. — Sehr einfach und erfolgreich ist die Züchtung in situ nach Plaut: Man legt einige erkrankte Haare oder Hautschüppchen auf einen sterilisierten Objektträger, drückt einen zweiten sterilen Objektträger fest darauf, nimmt beide auseinander und bedeckt nun das Material mit einem sterilen Deckgläschen, das man an den Ecken mit Wachströpfchen befestigt. Jeden Wasserzusatz vermeiden! Einlegen in eine feuchte Kammer (so feucht, dass eine auf den Objektträger geklebte Etikette sich nach 24 Stdn. leicht verschieben lässt). Die Pilze wachsen gut. Nach einigen Tagen vom Rande der Pilzwucherung Abimpfung auf Gel.- oder Agarplatten usw.

23. Amoeben.

Kulturen mancher Arten (Wasser-, Erd-, auch Darmbewohner) möglich. Zu versuchen in folgenden Substraten:

1. Heu- oder Strohnährboden. 20—40 g Heu oder Stroh werden mit 1 Liter Aq. communis $^1/_2$ Std. gekocht. Das Filtrat mit Natriumkarbonat leicht alkalisch machen, aufkochen, filtrieren. — Durch Zusatz von $1^1/_2$% Agar vor der Neutral. in festen Nährboden zu verwandeln.

2. Fucus crispus-Substrat: Aus Bouillon oder Leitungswasser hergestellt durch Zusatz von 5—15% Fucus crispus, kochen bis zur Lösung (lange!), alkalisieren (auf 10 ccm Nährboden 1 ccm $^1/_{10}$ Normal-Kalilauge).

3. Den üblichen Bakteriennährböden, auch folgender Kombination: Agar 0,5, Aq. commun. 90,0, alkal. Nährbouillon 10,0.

Reinkulturen zu erzielen ist nicht möglich, stets müssen Bakt. vorhanden sein, von denen die Amoeben sich nähren. Behandelt man solche Mischkulturen, in denen keine Bakteriensporen, Schimmelpilze und Hefen vorhanden sind und in denen die Amoeben Cysten gebildet haben, für ca. 72 Std. mit 20%iger Lösung wasserfreier Soda (vgl. S. 10 unten), so sterben die Bakterien ab; die Amoebencysten wachsen dann auf gewöhnlichen sterilen Substraten nicht aus, wohl aber, wenn sie auf Kulturen von solchen Bakterien übertragen werden, die ihnen als Nahrung dienen können. (So sind also Kulturen einer Amoebenart mit einer bestimmten Bakterienart möglich.) Klatschpräparate!

Untersuchung am besten frisch in der natürl. Flüssigkeit, ev. mit Zusatz 0,8%iger NaCl-Lösung. Zur Färbung Fixieren in gesätt. wässer. Sublimatlösung (2 g in 30 Aq. kochen, nach Erkalten filtrieren) 2 Teile + Alkohol absol. 1 Teil. Praep. noch feucht einige Sek. eintauchen! Dann 30 Min. auswaschen in 60%igen Alkohol + Jodzusatz bis zur bräunlicher Färbung, aufbewahren in 70%igem Alkohol. Vor Färbung Abspülen m. Wasser. Färbung mit Pikrokarmin (S. 47 b) 1/2—1 Std. ohne Erwärmen, auswaschen in 70%igem Alkohol + 0,1% HCl. Ev. vorsicht. Nachfärbung mit schwacher wäss. Lichtgrünlösung. Dann Alkohol absol., Zedernöl. — Gewebsstücke (Tropendysenteriedarm) fixieren in Sublimatalkohol (s. oben) 1/2 St., auswaschen in Jodalkohol (s. oben) 24 Stdn., Alkohol absol., Xylol, Einbetten in Paraffin. Schnitte wie frische Präparate (s. oben) färben.

24. Malariaparasiten.

Herstellung von Blutausstrichen vgl. S. 101. Bei wenig Parasiten: Einen grossen Blutstropfen auf Deckglas ausstreichen, lufttrocken werden lassen, einige Min. einlegen in eine Mischung von 2%igem Formalin und 1/2—1%iger Essigsäure $\overline{aa}$. Das Hämoglobin wird dadurch ausgezogen. Färben nach einer der folgenden Methoden:

a) Einfache Färbung nach Manson:

Solve Methylenblau med. pur. Höchst 2,0, Borax 5,0 in kochendem Wasser 100,0. Zum Färben mit Wasser verdünnen, bis Lösung in Reagenzglas eben durchsichtig ist. Bei frisch hergestellten Trockenpräparaten genügt Färbung in

der Kälte ca. 10—15 Sek. Alte Präparate färbt man besser mit Methylenblau 1,0, kristall. Soda 0,2, Aq. 100,0 für einige wenige bis zu 20 Sek. ohne Erhitzen. Abspülen in Wasser. Parasiten blau, rote Blutscheiben grünlich.

b) Doppelfärbung nach Loeffler mit der Methode S. 64.

c) Chromatinfärbung nach Giemsa (Modifikation der Methode Romanowsky-Nocht) C. B. I Or. 37, S. 308.

1. Fixieren des Ausstrichs in Äthylalkohol 15—20 Min. oder (nur 2—3 Min!) in Methylalkohol. Abtupfen mit Fliesspapier.
2. Färben mit „Giemsa-Farblösung f. die Romanowskyfärbung", (von Dr. Grübler-Leipzig.) — Farblösung in Tropfflasche füllen (vor Einfüllung der Lösung mit Alkohol absol. ausspülen!), davon in Mischcylinder auf je 1 ccm 30—40° warmen säurefreien destill. Wassers unter leichtem Umschwenken je 1 Tropfen Farblösung geben. Sofort auf Ausstrich in Schälchen giessen, 10—15 Min. einwirken lassen, Lösung womöglich einmal erneuern. (Alle Gefässe müssen peinlich sauber sein, völlig säurefrei!)
3. Abwaschen mit scharfem Wasserstrahl.
4. Trocknen, Einlegen in Immersionszedernöl. Chromatin der Parasiten leuchtend rot, Protoplasma blau, Leukocytenkerne rot bis violett, Protoplasma blau. Rote Blutzellen rosa bis braunrot. — Brauchbar auch zur Färbung in Schnitten.

25. Trypanosomen.

Im Blut lebend untersucht im häng. Tropfen + etwas 0,8 %iger NaCl-Lösung oder ausgebreitet zwischen Objektträger und Deckglas (mit Vaseline oder Wachs umrandet). Herstellung von Blutausstrichen s. S. 101. Färbung nach Giemsa (s. oben c) oder nach Loeffler: Präp. dünn ausstreichen und mit Alkohol absol. + Äther āā fixieren. Auf Deckglas 3 Tropfen 0,5 %iger Natr. arsenicosum-Lösung in Aq. dest. + 1 Tr. 0,5 %iger wässer. Malachitgrünkristalle-Chlorzinkdoppelsalz Höchst-Lösung tropfen, erwärmen bis zur Dampfbildung 1 Min. Abspülen m. kräft. Wasserstrahl. In Reagenzglas 5 ccm einer Mischung von Glycerin. puriss. 0,5, Aqua dest. 100 mischen mit 5—10 Tropfen Giemsa-Roma-

nowsky-Lösung (s. S. 97c), über der Flamme zum Sieden erhitzen und heiss auf Deckglas giessen. Nach 1—5 Min. abgiessen, kräftig im Wasserstrahl abspülen. (Glyzerin-Giemsamischung immer wieder brauchbar). Plasma der Tryp. blau, Kerne, undulier. Membran u. Geissel rot, Erythrocyten rosa.

Züchtung der Rattentrypanosomen möglich im Kondenswasser einer Mischung von Nähragar + defribin. Kaninchenblut aa. Reichlich besäen, bei 37° halten.

26. Syphilisspirochäten.

Die Sy.-spir. zeichnen sich vor anderen Arten aus durch ihre verhältnismässig schwere Färbbarkeit, ihre ausserordentliche Feinheit und durch ihre Gestalt: Besonders zahlreiche (10—26) und tiefe Windungen, auch in der Ruhe, beiderseits stark zugespitzte Enden. Lebend gut mit Dunkelfeldbeleuchtung zu beobachten. Züchtung nicht möglich.

Zur Färbung in Ausstrichen statt der gewöhnlichen Färbeverfahren, bei denen der Farbstoff stundenlang einwirken muss (nicht nach Gram färbbar)

a) nach Giemsa (D. m. W. 1905 Nr. 26, 1907 Nr. 17):

1. Ausstrich vom Rande unbehandelten Schanker oder Papeln auf Objektträger durch Darüberfahren mit Kante eines zweiten.
2. Fixieren in Alkohol oder vorsichtig in Flamme. Bei älteren Präp. Fixieren entbehrlich.
3. Färben wie auf S. 97c, 15—60 Min. ohne Erwärmen; bei Nr. 2 dort dem Wasser vor Zusatz der Farblösung 1—10 Tropfen 1 %iger K_2CO_3-Lösung zugeben.
   Oder Schnellfärbung: Mit Lösung S. 97c 2 übergiessen, bis zu leichter Dampfbildung erhitzen, 1/4 Min. bei Seite stellen, abgiessen, neue Lösung aufgiessen u. so fort etwa 4 mal; das letzte Mal die Farbe 1 Min. wirken lassen.
4. Ganz kurz abspülen in säurefreiem Wasser. Spirochäten intensiv dunkelrot, Grund schwach rötlich oder farblos, Zellen blau, Kerne rot, Erythrocyten rosa.

b) nach Loeffler: Wie Trypanosomen, s. S. 97.

Zur Färbung in Schnitten nach Levaditi (Hoffmann, D. m. W. 1906 Nr. 22).

1. Höchstens 2 mm dicke Organscheiben fixieren in Formalin 1 + Aq. 9 24 Stdn.
2. In 96%igen Alkohol ca. 15 Stdn.
3. In Aq. dest., bis Scheiben sinken. Aq. mehrmals wechseln.
4. Einhängen der Scheiben an Zwirnsfäden in frische Mischung von 90 ccm 1,5%iger $AgNO_3$-Lösung + 10 ccm reinsten Pyridins in dunkler Flasche mit Glasstopfen 3 Stdn. bei Zimmertemp., 3 Stdn. bei 45—50° im Paraffinofen (auch bis zu 6 Tagen in dieser Lösung lassen!)
5. Übertragen (nach Abspülen in 10%iger Pyridinlösung) in frische Mischung: 90 ccm 4%iger Pyrogallollösung + 10 ccm Aceton; davon 85 ccm + 15 ccm Pyridin. puriss. In dunkler Flasche mit Glasstopfen. 15 Stdn. (auch bis zu 2 Tagen).
6. Abspülen in Wasser, verdünnten, dann absol. Alkohol, Xylol, Einbetten in Paraffin, Schneiden u. ohne weitere Färbung untersuchen. Spirochäten schwarz infolge Versilberung.

27. Recurrensspirochäten.

Lebenduntersuchung und Färbung wie Syphilisspirochäten. Windungen weniger tief. Im Blut beim Anfall zahlreich. Züchtung nicht möglich. Dagegen wachsen Zahnspirochäten anaerob bei 37° in Pferdeserum 1 + Nähragar 2; nach ca. 10 Tagen hauchartige Kolonien.

28. Hundswutkörperchen.

Nachweis der Negrischen Körperchen nach Lentz:
1. 2—3 mm dicke Querschnitte vom Ammonshorn nach Methode b. S. 38 fixieren, härten u. einbetten. Schnitte auf Objektträger antrocknen (S. 37 sub 3), dann 1 Min. in Alkohol absol.
2. Färben mit Eosin extra B Höchst 0,5, 60%iger Alkohol 100,0.
3. Abspülen in Wasser.
4. Färben 1 Min. in Loefflers Methylenblau (S. 40.)
5. Abspülen in Wasser, Trocknen mit Fliesspapier.
6. Differenzieren in Alkohol absolutiss. 30,0 + 5 Tropfen 1%iger Lösung von NaOH in Alkohol absolutiss. bis zu blassrosa Färbung

7. Differenzieren in Alkohol absol. 30,0 + 1 Tropfen 50 %iger Essigsäure, bis Ganglienzellenzüge nur noch als schwachblaue Linien erscheinen.
8. Kurz abspülen in Alkohol absol., Xylol usw.

Negrische Körperchen karmoisinrot, ihre Innenkörperchen blau, Ganglienzellen nebst Kernen hellblau, ihre Kernkörperchen schwarzblau, Erythrocyten zinnoberrot.

Man kann auch aus einem frischen Ammonshornquerschnitt die Ganglienzellen mit Skalpellen herausheben, zwischen 2 Objektträgern zerquetschen, die Ausstriche noch feucht einige Min. in Methylalkohol fixieren, in Alkohol absol. abspülen und färben wie vor.

VII.

Entnahme von Untersuchungsmaterial aus dem Körper.

Körperflüssigkeiten, Sekrete, Exkrete usw., die bakterioskopisch untersucht werden sollen, sind so zu entnehmen und aufzubewahren, dass sie erstens nicht durch Keime der Aussenwelt verunreinigt werden, zweitens nicht mit Desinfektionsmitteln in Berührung kommen.

1. **Blut.** Kleine Quantitäten werden aus dem Ohrläppchen oder der Vorderarmbeugeseite, auch wohl der Fingerstreckseite entnommen (Fingerkuppe ist nicht zu empfehlen, da sie schwer zu säubern ist und die zur Blutentnahme notwendige Verletzung Belästigung schafft). Abwaschen der Haut mit Wasser und Seife (oder Seifenspiritus), dann mit Alkohol, Äther und Watte. Gut reiben, damit Hautstelle blutreich wird. Trocken werden lassen, dann Einstechen mit steriler Nadel oder Lanzette. Auffangen des Blutes in sterilem Röhrchen oder Schälchen oder Aufsteigenlassen in Kapillaren (etwa 6—8 cm Länge, 2 mm lichte Weite, abgeschmolzene Enden vorher abgebrochen, nach Eintritt des Blutes die Enden mit Siegellack oder Wachs verschliessen. Die Kapillarmethode ist besonders zur Gewinnung von Blut für die Widalsche Reaktion bei Typhus usw. brauchbar. Das Serum scheidet sich von selbst ab (im Eis-

schrank), ev. fördert man die Abscheidung durch Zentrifugieren. Zur Entnahme des Serums bricht man die Kapillaren an der Grenze von Serum und Blutkuchen durch (Strich mit dem Glaserstahl) und berührt die freie Öffnung mit der Spitze einer mit Hundertstel-Teilung versehenen 1 ccm-Pipette, in die das Serum von selbst einsteigt. In der Pipette sammelt man das Serum aus mehreren Kapillaren, bläst es dann in ein Röhrchen aus und verdünnt beliebig. Weiteres s. S. 77 unter Typhusbaz. — Hautwunde mit steriler Watte und Heftpflaster bedecken!

Grössere Mengen Blut entnimmt man entweder durch Schröpfkopf am Rücken (Reinigen der Haut wie beschrieben, Ansetzen eines trockenen sterilen, über der Flamme erwärmten Schröpfkopfes; Inzision mit sterilem Schnepper, Schröpfkopf wieder ansetzen, nach Abnahme mit sterilem Wattebausch schliessen) oder aus der Vena mediana (Reinigen der Haut wie beschrieben, Esmarchschen Schlauch am Oberarm anlegen, so dass Venen anschwellen, aber Radialpuls noch deutlich fühlbar ist, Spritze (Luersche Glasspritze zweckmässig) in die Vena mediana einstechen, das Blut steigt bei richtiger Lage der Spritze von selbst in sie ein.) Aussaat des Blutes noch flüssig in verflüss. 42° warmen Agar (s. S. 88 sub 16). Soll das Blut nicht auf Bakteriengehalt untersucht werden, sondern als Nährboden dienen, wird 1 Blut zu 3 Agar oder beliebig viel Bouillon zugesetzt (s. auch S. 61, 65 und 91 sub 4).

Entnahme von Placentarblut s. S. 90. (Gonokokken 1).

Blutentnahme an der Leiche am besten aus dem Herzen mit der Spritze nach vorherigem Verschorfen der Oberfläche mit glühendem Messer an der Einstichstelle.

Um Blutpräparate zur mikroskop. Untersuchung herzustellen, taucht man in das aus der Stichwunde austretende Bluttröpfchen eine Kante eines in der Flamme sterilisierten und wieder erkalteten Deckglases und streicht mit der blutbeladenen Kante sogleich je in einem Zuge über die Fläche mehrerer sauberer Deckgläschen oder Objektträger. Die Blutschicht soll dünn und gleichmässig sein. Fixieren nach Trockenwerden in Alkohol absol. oder + Äther $\overline{aa}$ $^1/_4$—24 Stdn. oder auch noch feucht mit Osmiumsäuredämpfen (s. S. 34; möglichst kurz, weil Färbbarkeit leidet; Abspülen in $KMnO_4$-Lösung danach). Fixieren in der Flamme schädigt die Form der roten Blutkörperchen.

2. **Eiter.** Gewinnen durch aseptische Inzision oder Punktion, Auffangen in sterilem Gefäss (Röhrchen oder Schälchen). Kleine Mengen Eiter lässt man in ein zur Kapillare ausgezogenes steriles, oben mit einem Wattebausch verschlossenes Glasröhrchen steigen und bewahrt dies bei etwaigem Transport in einem sterilen Reagenzglas so auf, dass sein oberer Teil von dem Wattestopfen des Reagenzglases festgehalten wird.

3. **Rachensekret** und **-belag** (Angina, Diphtherie). Betupfen der erkrankten Teile entweder mittelst der Platinöse oder mit einem am Ende rauhgefeilten sterilen Glasstab, einem am Ende eines Holzstäbchens oder Drahtes befestigten sterilen Wattebausch, einem sterilen, mit der Pinzette gefassten Schwämmchen. Man hält sich zweckmässig sterile Reagenzgläschen mit Wattebauschverschluss vorrätig, in denen die Glasstäbe oder die Drähte mit dem Wattebausch so liegen, dass sie durch den Wattestopfen des Reagenzglases festgehalten werden und ihr zum Anfassen bestimmtes Stück frei herausragt. Nach Betupfen der Rachenorgane bringt man den Stab, wenn die Aussaat nicht sofort erfolgen kann, wieder in das Röhrchen hinein und fixiert ihn durch dessen Wattestopfen. Zieht man Schwammstückchen zur Entnahme vor, so hält man erbsengrosse Stückchen davon sterilisiert, jedes einzeln in sterilisierten Wachspapierkuverts verschlossen, vorrätig, fasst sie zum Betupfen des Rachens mit einer Pinzette des Taschenbesteckes und bringt sie materialbeladen bis zur Aussaat ins Kuvert zurück. — Nasensekret unter Benutzung des Nasenspiegels durch Platinöse oder durch Kornzange mit sterilem Wattebausch entnehmen. — Nasenrachenraumsekret entnimmt man mit Hilfe biegsamer (Kupfer-)Drähte, an deren Ende ein Wattebausch befestigt ist, vom Munde her. Der Draht wird in einem Reagenzgläschen steril bewahrt, vor Benutzung mit steriler Pinzette in die gewünschte Form gebogen, nach der Entnahme wieder zurückgebogen, damit er wieder in das Reagenzglas einzuführen ist.

4. **Sputum.** Auffangen möglichst speichelfrei in sterilen (oder wenigstens ganz sauberen) Gefässen, die steriles Wasser, aber kein Desinfizins enthalten dürfen.

5. **Fäces.** Auffangen in sauberem Gefäss ohne Desinfiziens. Ev. direkt aus dem Anus mit geeignetem sterilen Instrument entnehmen. Falls Schleimflocken zur Untersuchung

erwünscht (s. S. 80 u. 82), in Schale mit sterilem Wasser den Stuhl zerrühren.

6. **Urin.** Ersten Strahl fortlaufen lassen, den Rest in sterilem Kolben auffangen. Auch Entnehmen mittelst sterilen Katheters. Zur Untersuch. ev. zentrifugieren.

7. **Ex- und Transsudate.** Zu entnehmen durch Punktion mit steriler Spritze oder Troikart nach Desinfektion der Haut; Zerebrospinalflüssigkeit durch Lumbalpunktion. Zur Untersuch. ev. zentrifugieren. — Nährböden daraus s. S. 15, 16 u. S. 91 sub 3.

VIII.

Bakteriologische Untersuchung von Wasser, Luft und Boden.

Wasseruntersuchung.

Entnahme der Wasserproben: Aus Pumpbrunnen fängt man das Wasser in sterilen Reagenzröhrchen (nach Abbrennen ihres Randes) im Anfange des Pumpens und nach längerem Abpumpen auf. Aus offenen Brunnen. Quellen, Wasserläufen etc. entnimmt man das Wasser in ein steriles Reagenzglas, wenn möglich von Hand oder durch Herablassen des Röhrchens an einer Schnur, oder man braucht besondere Apparate, die auch zur Entnahme des Wassers aus tieferen Wasserschichten dienen (z. B. von Esmarchs Kolben, dessen dichter durch ein gummibezogenes Bleigewicht erfolgender Verschluss in verschiedener Wassertiefe gelüftet werden kann, oder sog. Abschlaggläser nach Sclavo: Reagenzgläser, deren in ein dünnes Röhrchen ausgezogener, umgebogener und zugeschmolzener Hals nach Herablassen des Röhrchens in die gewünschte Tiefe durch ein an einer Schnur herabfallendes Gewicht zerschlagen wird, worauf sich das Röhrchen mit Wasser füllt).

Aufbewahren der Proben bis zur Untersuchung: Kann man nicht sofort, was das Beste ist, das Wasser untersuchen, so bewahrt man die Proben in Eis verpackt.

Ansetzen der Proben zur Untersuchung: Will man nur die Arten der im Wasser vorhandenen Bak-

terien kennen lernen, so bringt man eine beliebige Menge des zu untersuchenden, unmittelbar vorher umgeschüttelten Wassers (nach dem zu erwartenden Keimreichtum 1 Öse bis 1 ccm) in verflüssigte Gelatine, mischt gut und giesst zur Platte aus. — Handelt es sich um **Bestimmung des Keimgehaltes** eines Wassers, so verfährt man wie folgt: Mit steriler Pipette bringt man 1 Tropfen (d. h. 0,05 ccm) bis 1 ccm des Wassers in ein steriles, leeres Petrischälchen. (Man mache von jeder Wasserprobe stets mindestens zwei Aussaaten und zwar verschiedener Mengen!) Von sehr keimreichem Wasser (aus Ziehbrunnen, Flüssen, Sümpfen etc.) verdünnt man vor der Aussaat 1 ccm auf das 10—100fache mit sterilem Wasser (also mit 9—99 ccm!) und sät von der Verdünnung 0,1 bis 1,0 ccm (gleich dem zehnten bis hundertsten Teile des zu untersuchenden Wassers) aus. Zu dem Wasser in dem Schälchen fügt man etwa 10 ccm steriler, flüssiger 30—40° warmer Nährgelatine aus einem Röhrchen nach Abbrennen seines Randes hinzu, vermischt durch Neigen und Drehen des Schälchens Gelatine und Wasser sorgfältig, lässt auf wagerechter Unterlage erstarren und bebrütet bei 20—22° 48 Stunden lang. (Rezept der amtlich empfohlenen Gelatine zur Wasseruntersuchung s. S. 12 oben.) Dann Zählung der Kolonien: Man stellt das Schälchen auf eine schwarze Glasplatte mit eingeritzter Teilung in 1 qcm und $^1/_9$ qcm-grosse Flächen (Platte des Wolffhügelschen Apparates), zählt bei geringer Kolonienzahl mit der Lupe sämtliche Kolonien und berechnet daraus die Zahl der in 1 ccm Wasser enthaltenen, in Gel. nach 48 Stdn. zur Entwickelung kommenden Keime. Bei dichter bewachsenen Platten zählt man die Kolonien in mindestens 10 qcm (oder, wenn qcm nicht mehr zählbar sind, in 20 $^1/_9$ qcm). Aus den erhaltenen Zahlen zieht man den Durchschnitt für die Kol.-Zahl in 1, bezw. $^1/_9$ qcm, berechnet durch Multiplikation mit der Schälchenfläche in qcm oder $^1/_9$ qcm (Schälchenfläche $= r^2\pi$, r in cm ausgedrückt) die Zahl der Kol. in der ausgesäten Wassermenge und, bei Aussaat von weniger als 1 ccm, daraus wieder die Zahl der in 1 ccm Wasser enthaltenen Keime. — Statt Quadrate kann man auch Sektoren zählen. Man stellt das Schälchen auf Fliesspapier, umzieht es mit Bleistift und teilt den entstandenen Kreis in eine Anzahl gleich grosser Sektoren, von denen man einige auszählt, um daraus die Zahl der Kolonien in dem Schälchen und in 1 ccm Wasser zu berechnen. Die Resultate werden dabei etwas genauer

als bei Auszählung von Quadraten. (Die Schälchen haben stets einen gewölbten Boden. Infolgedessen ist in der Mitte die Gelatineschicht dünner und die Zahl der Kolonien kleiner als am Rande. Beim Zählen von Sektoren trifft man daher immer auf dünn und auf stark bewachsene Stellen, beim Quadratauszählen nicht.) — Sehr stark bewachsene Platten zählt man unter dem Mikroskop bei schwacher Vergrösserung. Man berechnet mit Hilfe eines Objektivmikrometers die Grösse des Gesichtsfeldes bei Anwendung einer bestimmten Linsenkombination und Tubuslänge. Dann zählt man die Kolonien in mindestens 10 Gesichtsfeldern, zieht den Durchschnitt und multipliziert ihn mit dem Faktor, der angibt, wie vielmal das Schälchen grösser ist als ein Gesichtsfeld. Dann weiss man, wie viele Kolonien auf der Platte, d. h. aus der ausgesäten Wassermenge entwickelt sind, und berechnet daraus die Zahl der Keime pro 1 ccm Wasser.

Geben verschiedene Aussaaten derselben Probe verschiedene Zahlen, so betrachte man die gefundene höchste als die richtige.

Fehlen Schälchen zur Kulturanlage, so bringt man die auszusäenden Wasserquanta in Röhrchen mit verflüss. Gelatine, stellt Rollröhrchen her (vgl. S. 20), bebrütet diese wie Schalen und zählt sie nach 48 Stdn. mit besonderem Zählapparate.

Vermischt man das Wasser im Röhrchen mit Gelatine und giesst dann zu Platten aus, so muss man ausser den Platten den im Röhrchen bleibenden Gelatinerest bebrüten und die Kolonien darin zählen.

Man füge bei der Angabe des Keimgehaltes eines Wassers stets eine Bemerkung bei, nach welcher Zeit die Zählung der Platten erfolgt ist (manche Keime entwickeln sich erst nach 3, 4 und mehr Tagen auf der Gelatine zu sichtbaren Kolonien), bei welcher Temperatur das Wachstum erfolgte und welche Reaktion (Menge von Alkali über den Lackmusneutralpunkt hinaus), ev. auch, welche Zusammensetzung die Gelatine hatte. F ü r v e r g l e i c h e n d e U n t e r s u c h u n g e n ist die Gel. S. 12 oben zu benutzen und die Aussaat 48 Stdn. bei 20—22° zu züchten.

A l s A g a r n ä h r b o d e n zur Wasseruntersuchung wird von Hesse und Niedner, Zschr. f. Hyg. Bd. 29, ein Substrat aus 100 Aq. comm., 1,25—2 Agar und 0,5—1 Nährstoff Heyden, bereitet gemäss dem Rezept S. 57 a, empfohlen. Neutralisation ist nicht nötig. Platten aus diesem Nährboden,

der entgegen der üblichen Nährgelatine stets gleichmässig ausfällt, erlauben wegen des Fehlens der Verflüssigung längere Beobachtung als Gelatineplatten. Der Nährboden lässt aber die Fäkalbakt. schlecht wachsen!

Zur weiteren Untersuchung der gewachsenen Organismen legt man von allen verschieden aussehenden oder von bestimmten, besonders interessierenden Kolonien Reinkulturen an.

Untersuchung von Wasser auf Typhusbaz. und Choleravibr. s. S. 79 und S. 84 Nr. 4.

Luftuntersuchung.

1. Zur ungefähren Bestimmung der Keimarten in der Luft setzt man ihr Gelatine-, Agarplatten oder auch nach S. 16 Nr. 1 präparierte Kartoffeln längere oder kürzere Zeit offen aus.

2. Aus grösseren Luftmengen die Keime quantitativ abzufangen erlaubt die Methode von Petri. Mittelst einer Pumpe mit Zählwerk wird eine bestimmte Menge Luft durch zwei kleine Filter von Sand oder Glasbröckchen von 0,25 bis 0,5 mm Korngrösse gesaugt, die in einer Glasröhre, mit Metall-Gazestückchen nach aussen und voneinander abgegrenzt, natürlich vorher sterilisiert, sich befinden. Filtermaterial und Gaze wird dann mit Gel. oder Agar zu Platten verarbeitet. Bei fester Zusammenpressung der Filter hält schon das erste alle Keime zurück. Als Filtermaterial ist auch gepulverter Zucker zu verwenden, der sich dann bei der Aussaat in der Gelatine auflöst (ist aber schwer zu sterilisieren!).

3. Am einfachsten ist langsames Durchsaugen der Luft durch 3 mit je 2 ccm sterilen Wasser gefüllte, wie Spritzflaschen mit Gummistopfen und Glasröhren versehene und miteinander verbundene Reagenzgläschen. Die Luft gibt ihre Keime an das Wasser ab. Dieses wird zum Schluss in bestimmten Mengen mit Nährgelatine zu Platten verarbeitet, — vgl. S. 104.

Aus der Luft abgesetzten Staub nimmt man mittelst steriler, mit Bouillon befeuchteter Schwämmchen auf. Man drückt diese in flüssiger Gelatine oder Agar aus und giesst daraus Platten. Will man auf Tuberkelbazillen untersuchen, so drückt man die Schwämmchen in Bouillon aus und spritzt diese in die Bauchhöhle von Meerschweinchen.

Bodenuntersuchung.

Mit der zu untersuchenden Bodenprobe füllt man ein Platinlöffelchen von bestimmten Inhalt und sät in Platten

oder Rollröhrchen aus. Im Boden viele anaërobe Bazillen; ev. speziell auf diese hin Kulturen anlegen. Oder man schüttelt ein bestimmtes Quantum Boden mit steriler Kochsalzlösung kräftig, und sät ein aliquotes Quantum dieser Lösung in Nährgelatine etc. aus. (Nicht quantitativ genau, denn selbst starkes Schütteln löst nicht alle Keime von den Bodenkörnchen ab.)

Zur Untersuchung tieferer Bodenschichten gräbt man entweder eine Grube, von deren Wänden man Erde abkratzt und aussät, oder man benutzt den Fränkelschen Bohrer. Dieser wird unter Umdrehungen in einer bestimmten Richtung in die Erde getrieben; hat er die gewünschte Tiefe erreicht, so wird er in umgekehrter Richtung einige Male umgedreht, wodurch sich eine an der Spitze des Bohrers befindliche Kammer öffnet und mit Erde füllt. Dann wird er unter Drehen in der ersten Richtung wieder herausgezogen. Aussaat wie vorbeschrieben.

Zur Prüfung von Bodenproben auf infektiöse Mikroorganismen (Tetanus, malignes Ödem, Milzbrand) bringt man Versuchstieren etwas von dem Materiale selbst oder damit geschüttelte 0,8 %ige NaCl-Lösung subkutan bei.

IX.

Tier-Impfung und Sektion.

Impfung.

Wenn Haare oder Federn an der für die Impfung ausgesuchten Stelle stören, schneide man sie fort. Reinigen der Haut durch Abseifen, dann mit Alkohol, dann mit Sublimat, dann mit sterilem Wasser kann erfolgen.

1. Kutane Impfung: Man ritzt die Haut des Tieres leicht ein und bringt mit der Platinöse das Impfmaterial in die Wunde. Oder man rasiert eine Hautstelle und reibt das Infektionsmaterial kräftig darauf ein.

2. Subkutane Impfung:

a) in eine Hauttasche. Man hebt mit der Pinzette eine Hautfalte auf, schneidet mit steriler Schere eine kleine Öffnung hinein und bohrt mit steriler Lanzennadel oder einer

Scherenhälfte eine kleine Tasche ins Unterhautgewebe. In diese führt man darauf das Infektionsmaterial mit der Platinöse ein.

Als Impfstelle wählt man bei Ratten und Mäusen vorzugsweise die Gegend über der Schwanzwurzel; die Tiere werden im Nacken mit einer langen Kornzange gefasst, am Schwanz mit der Hand gehalten. Bei Meerschweinchen nimmt man als Infektionsstelle gern die Bauch- oder Brustseite, bei Kaninchen die Innenseite des Ohres, die man mit der Lanzennadel ein Stückchen weit einritzt und unterminiert. Vögel infiziert man mit Vorliebe in den Brustmuskel.

b) mit der Spritze. Zur subkutanen Injektion bedient man sich verschiedener Arten von Spritzen: die von Pravaz (Modifikation mit verstellbarem Asbeststempel!), Koch, Stroschein, Loeffler (mit einem leicht selbst zu fertigenden Gummistempel) sind die besten; die Spritzen müssen vor und nach Gebrauch im Dampfstrom oder mit Alkohol-Äther sterilisiert werden. Eine vorherige Desinfektion der Einstichstelle ist unnötig. Impfung an denselben Stellen wie bei a) angegeben. (Kaninchen unter die Bauchhaut.)

3. Intraperitoneale Impfung. Einschneiden der Bauchhaut. Langsames Einbohren einer stumpfen Kanüle durch die Muskulatur in die Bauchhöhle.

4. Intramuskuläre, intrapleurale etc. Impfungen ähnlich wie die vorigen.

5. Zur Impfung in die vordere Augenkammer durchtrennt man die kokainisierte Cornea oben nahe dem Skleralrande (wie bei der Iridektomie) und schiebt das Infektionsmaterial ein. Auge danach für einige Zeit verbinden. Auch Injektion mit der Spritze. — Impfung in die kokainisierte Kornea (z. B. mit Vaccine) durch ganz flachen tangentialen Einstich, wobei Pinzette durch Fassen einer Bindehautfalte Auge fixiert.

6. Injektion in die Blutbahn: Freilegen einer beliebigen, leicht erreichbaren Vene (z. B. Jugularis externa), Einführen einer feinen spitzen Kanüle in diese und Injektion zentripetal. Achtung, dass keine Luft mit injiziert wird (Tod an Luftembolie!). — Bei Kaninchen wählt man gewöhnlich eine Ohrvene zur Injektion. Hautschnitt parallel zu der Vene an der Aussenseite des Ohres, dann Verschieben der Haut so, dass die Vene im Schnitte liegt. Ohrwurzel zusammendrücken, damit die Vene anschwillt, und Kanüle

einstechen. Schwillt das umgebende Gewebe bei der Injektion auf, so liegt die Kanülenspitze nicht in der Vene!

7. Zu Injektionen in den Magen steckt man den Tieren einen Holzknebel zwischen die Vorderzähne, durch dessen Bohrung man einen elastischen Katheter bis in den Magen hindurchschiebt. Durch diesen werden dann die Infektionsmaterialien etc. den Tieren in den Magen gespritzt. Grösseren Tieren kann man auch so tief in den Rachen, dass sie sie verschlucken müssen, Kartoffelstückchen stecken, die man ausgehöhlt, mit Infektionsmaterial gefüllt und wieder mit einem Deckelchen aus Kartoffelsubstanz geschlossen hat (desgl. infizierte Brotkügelchen!).

8. Impfung durch Fütterung. Das zu verfütternde Material wird, wenn es selbst kein Nahrungsmittel ist, mit einem solchen gemischt gereicht (z. B. Kulturen auf Brot gestrichen oder geträufelt etc.).

9. Infektion von den Luftwegen aus. Inhalation verstäubter oder versprengter Keime in besonderen dicht schliessenden Inhalationsapparaten. Oder Injektion in die Trachea durch Einstechen der Spritzennadel zwischen zwei Trachealringen.

Dosieren des Impfmaterials:

Zur Injektion bestimmter Impfstoffmengen in den Körper verfährt man wie folgt:

1. Flüssige Impfstoffe (wenn nötig Verdünnung abgemessener Mengen mit bestimmten Quanten steriler Bouillon oder 0,8 %iger NaCl-Lösung vorher) injiziert man mit Hilfe kalibrierter Spritzen in der gewünschten Menge.

2. Nichtflüssige Impfstoffe. Zur Impfstoffentnahme dient eine Platinöse an einem kurzen Platindraht, dessen anderes Ende sich an einem Stab durch eine Schraubvorrichtung (wie bei Taschenbleistiften) befestigen lässt. Der Draht wird in ein Stück Kork gesteckt und auf der Präzisionswage gewogen, dann mit Impfmaterial beladen und wieder gewogen. Die Differenz beider Wägungen gibt das Gewicht des Impfmateriales. Nun spült man die Öse in einem Röhrchen mit so viel steriler Flüssigkeit ab, dass eine bestimmte, leicht abmessbare Menge davon (z. B. 0,5 ccm) die zu verimpfende Materialmenge (z. B. 0,2 mg) enthält, mischt durch Verreiben und Umschütteln gut und injiziert. Bei Verwendung der gleichen Platinöse, gleichen Impfmateriales und stets ungefähr gleicher Füllung der Platinöse bekommt man so gleichmässige

Werte, dass man von der Wägung Abstand nehmen kann. Man fertige sich Ösen, die etwa 2 mg 24stündiger Agarkulturrasen von Typhusbaz. oder Cholerav. bei vollständiger Füllung aufnehmen, — sog. Normalösen; Massstäbe zur Herstellung gleichgrosser Ösen von Czaplewski angegeben.

Bestimmung der Bakterienzahl im Impfmaterial. Man entnehme das Impfmaterial wie vorbeschrieben und säe eine gleiche Menge der Aufschwemmung, wie injiziert wird, in Agar oder Gelatine zur Platte aus. Ev. verdünne man vorher nochmals mit steriler Bouillon in bestimmter Menge und säe einen aliquoten Teil der Verdünnung aus.) Nach Entwickelung zählen wie bei Wasserplatten (s. S. 104). Auf dieselbe Weise Bestimmung der Bakterienzahl in allerlei Materialien.

Bezeichnung und Aufbewahrung der Versuchstiere. Mäuse und Ratten in hohe Gläser (Einmachgläser) mit Drahtnetzdeckel setzen, die Gläser etikettieren. Meerschweinchen in Steintöpfen mit Drahtdeckel halten, nach Gewicht, Geschlecht, Färbung beschreiben. (Man hat besondere Clichés mit Tierbildern zur Einzeichnung der Farben.) Kaninchen zur Kennzeichnung die Ohren mit verschiedenen Anilinfarben tingieren oder, wie ev. auch Meerschweinchen, mit bezifferten Metallmarken, die durch das Ohr gestochen werden, bezeichnen. Infizierte Tiere in besondere Käfige setzen, möglichst jedes für sich!

Temperaturmessungen infizierter Tiere mittelst Einführung eines Maximalthermometers mit kleinem Hg-Gefäss in anum. Normale Temperaturen sind für Hund 37,5 bis 39,9 °C, Kaninchen 38,3—39,9 °, Meerschweinchen 37,3 bis 39,5 ° (meist ca. 38 °), Taube 41,0—42,5 °, Huhn 41,0—42,5 °.

Immunisierung von Tieren durch Injektion steigender Dosen von Bakteriengiften, abgetöteten oder lebenden Bakterien wechselnd nach der Art der Bakterien und dem verfolgten Zweck. Allgemein verfährt man so, dass die erste Injektion subkutan oder intraperitoneal usw. mit einer unter der Dosis letalis minima belegenen Kultur- oder Giftmenge erfolgt. Man beobachtet genau Änderungen im Befinden des Tieres und lässt die zweite Injektion mit etwas grösserer Gift- oder Kulturmenge erst folgen, wenn es völlig wiederhergestellt ist, namentlich auch an Gewicht zu- oder wenigstens nicht abgenommen hat. Ebenso geht man bei den folgenden Injektionen vor. — Immunisierung zur Gewinnung von

Serum für die Widalsche Reaktion durch Injektionen der durch Erwärmen über 1 Std. auf 60—65° abgetöteten Typhus-, Cholera- usw. Kulturen. Bei Kaninchen genügen meist schon 3—5 Einspritzungen bei intravenöser Applikation in Abständen von je 7 Tagen und mit Steigung von 1 zu 10 Ösen abgetöt. Agarkultur. 7 Tage nach der letzten Injektion Blutentnahme aus einem Blutgefäss des Ohres, der Jugularis oder Karotis: Gefäss aseptisch frei legen, oben und unten lose Unterbindungsschlingen anlegen, Eröffnen durch Schlitzschnitt in der Längsachse, Unterbindungsschlingen nach genügender Blutung (Auffangen in sterilem Gefäss) zuziehen. Bei grösseren Tieren ohne Hautschnitt Jugularis gegen Wirbelsäule andrücken und distal davon mit Troikart oder Spritze einstechen. Blutentnahme von Tauben s. S. 65 unter 8. Blut im Eisschrank 24—48 Stdn. bewahren, dann Serum steril abpipettieren (ev. zentrifugieren).

Sektion.

Die Sektion soll sobald als möglich nach dem Tode erfolgen. Muss sie aufgeschoben werden, so halte man das Kadaver durch Aufbewahrung in kühlem Raume frisch.

Das zu sezierende Tier soll vor der Sektion womöglich nicht, bei der Sektion keinesfalls (ausgenommen grosse Tiere) mit den Händen, sondern nur mit Instrumenten berührt werden. Die bei der Ausführung der Sektion zu benutzenden Instrumente werden bereit gelegt. Alsdann wird das Tier aufgespannt mit der Bauchseite nach oben und mit weit vom Rumpf abgezogenen Extremitäten. Die Pfoten, Füsse oder Flügel werden mit Stecknadeln, Nägeln oder Pfriemen auf dem Sezierbrett befestigt oder auch mit Fadenschlingen an eingeschraubten Haken auf dem Brett angebunden. Nun befeuchtet man die Bauch- und Brusthaut mit Sublimatlösung tüchtig, um das Umherspritzen der Haare beim Durchtrennen der Haut zu vermeiden oder mit Xylol, um auch etwaiges Ungeziefer zu töten, oder man rasiert von der eingeseiften Haut die Haare ab; auch Abbrennen der Haare vor dem Anfeuchten ist zweckmässig. Vögel rupft man an Brust und Bauch und feuchtet die Haut darauf an. Dann wird die Haut vom Hals bis zur Symphyse mit sterilisierten (s. S. 6 u. 7 sub 1, 2, 3) Instrumenten in der Mittellinie durchtrennt und nach beiden Seiten bis auf die Innenseite der Beine hin abpräpariert und zurückgeschlagen. Abbrennen der freigelegten Muskulatur zur

Beseitigung darauf gefallener Haare. Nunmehr durchtrennt man mit frisch sterilisierten Instrumenten eine hochgehobene Falte der Bauchmuskulatur unterhalb des Proc. xiphoideus, schlitzt die Bauchmuskulatur mit der nach oben gekehrten Messerschneide in der Mittellinie oder noch besser mehr nach der rechten Körperseite des Tieres zu auf, löst sie von den Rippenbögen und schlägt die Muskellappen nach beiden Seiten auseinander, worauf man sie zweckmässig mit Stecknadeln über den zurückgeklappten Hautlappen befestigt. Den nach der linken Seite des Tieres fallenden Muskellappen macht man deshalb grösser als den rechten, damit die später hervorzuziehende Milz, dieses bei den meisten Infektionskrankheiten so wichtige Organ, auf ihm ruhen kann und durch ihn vor Verunreinigungen von der Haut her geschützt ist. Bei Ratten und Mäusen zerreisst man die Bauchmuskulatur mit zwei Pinzetten anstatt sie zu durchschneiden. Nach Besichtigung der Organe der Bauchhöhle und Anlage der gewünschten Kulturen aus ihnen öffnet man die Brusthöhle, indem man von unten her anfangend die Rippen ein Stück seitwärts vom Sternum beiderseits mit steriler Schere durchschneidet; dann zieht man den Processus xiphoideus in die Höhe und klappt an ihm nach Ablösung des Diaphragma das Sternum mit den daran haftenden Rippenpartien nach oben, so dass die Organe der Brusthöhle freiliegen.

Man brenne jedesmal die Instrumente sorgfältig ab oder wechsle sie, sobald man glaubt, dass sie mit irgend etwas nicht gewolltem in Berührung gekommen sind. Lege nie gebrauchte Instrumente ohne sie vorher abzubrennen aus der Hand!

Organe, aus denen man Kulturen anlegen will, (vgl. auch S. 33 unten) ritzt man mit einem spitzen sterilen Instrument an; mit der Platinöse geht man dann durch den Ritz ins Innere des Organes ein und sät die an der Nadel haftenden Organteilchen sofort aus. Muss man annehmen, dass die Oberfläche des Organes verunreinigt worden ist, so verschorfe man sie zuerst durch Auflegen einer heissen Messerklinge und verfahre dann wie angegeben. Will man grössere Stückchen aussäen, so schneidet man sie mit steriler Schere ab und nimmt sie mit noch heisser Platinöse, an der sie leichter haften, auf. Harte Knoten (z. B. in tuberkulösen Organen) schneidet man mit steriler Schere heraus, zerquetscht sie

nimmt man
bene Falte
eos, schlitzt
rten Messer-
ehr nach der
on den Rippen-
iden Seiten zu
Stecknadeln über
Den nach der
ppen macht man
e später hervorzu-
ktionskrankheiten so
durch ihn vor Ver-
ist. Bei Ratten und
latur mit zwei Pin-
Nach Besichtigung
age der gewünschten
usthöhle, indem man
in Stück seitwärts vom
e durchschneidet; dann
die Höhe und klappt
na das Sternum mit den
ben, so dass die Organe

umente sorgfältig ab oder
ass sie mit irgend etwas
ommen sind. Lege nie
hne sie vorher abzu-

ulturen anlegen will,
nit einem spitzen sterilen In-
eht man dann durch den Ritz
sät die an der Nadel haften-
Muss man annehmen, dass die
inigt worden ist, so verschorfe
iner heissen Messerklinge und
Will man grössere Stückchen
mit steriler Schere ab und
Platinöse, an der sie leichter
B. in tuberkulösen Organen
here heraus, zerquetscht sie

zwischen zwei sterilen (S. 6 sub 1) Objektträgern oder Skalpellen und bringt Stückchen auf Nährböden und Deckgläschen.

Sollen die Aussaaten erst später erfolgen, so schneidet man Stücke der Organe steril ab und legt sie in sterile Doppelschälchen (jedes Organ für sich!).

Stets bakterienhaltige Organe, wie der Darm, dürfen erst zu allerletzt, nachdem für Aussaaten aus den andern Organen Sorge getragen worden ist, geöffnet werden.

Man beachte bei der Sektion stets den Zustand der Impfstelle!

Zur Herstellung mikroskopischer Präparate reisst man mit der Pinzette Gewebsstückchen ab, verreibt sie auf dem Deckglase und färbt dann (s. S. 33 ff).

Konservierung von Gewebsstücken zur Untersuchung in Schnitten s. S. 36 u. 38.

Nach Beendigung der Untersuchung wird das Kadaver in einem Ofen (Kesselfeuerung) verbrannt oder in Pergamentpapier eingehüllt vergraben oder im Dampf je nach Art der Infektionskeime 1—4 Stdn. gekocht und dem Abdecker übergeben; das Sezierbrett wird mit 1—2 ‰ igem Sublimat + 3 % HCl abgewaschen; die Pfriemen etc. werden abgebrannt.

X.

Konservierungsmethoden für Präparate, Kulturen und Tierorgane.

A. Präparate.

Hängende Tropfen kann man lange Zeit konservieren, doch tritt dabei eventuell Weiterentwickelung und schliesslich Zerfall der Mikroorganismen ein. Will man ein bestimmtes Entwickelungsstadium festhalten, so nimmt man das Deckglas ab, setzt zu dem Tropfen oder an eine Ecke des Deckglases ein Tröpfchen Formalin oder eine Spur 2 %iger Osmiumsäure und bringt das Deckglas wieder in seine Lage.

Konservierung gefärbter Präparate s. S. 35 u. 39.

Schimmelpilze und Hefen bewahrt man ungefärbt am besten in Glyzeringelatine (Glyzerin 7, Aqua 6, Gelatine 1, 1 %ige Karbolsäure 1, zusammen erwärmt und filtriert). Umranden mit Lack.

B. Kulturen.

Fortzüchtung von Kulturen und Aufbewahrung lebenden Bakterienmaterials s. S. 22—23.

Will man Kulturen, die ein bestimmtes charakteristisches Entwickelungsstadium aufzeigen (z. B. Gelatinestichkulturen von Choleravibrionen mit dem typischen „Luftbläschen“ an der Oberfläche) zu Demonstrationszwecken aufbewahren, so tötet man sie zunächst durch Formaldehyddämpfe ab.

Bei Kulturen im Röhrchen bringt man dazu auf das untere Ende des Wattebausches einige Tropfen Formalin, setzt den Bausch wieder auf, verschliesst das Röhrchen mit einer Gummikappe und lässt es mindestens 24 Stunden stehen. (Ist die Kultur in Gel. angelegt und hat diese verflüssigt, so lange stehen lassen, bis der Nährboden unter der Wirkung des Formaldehyd wieder fest geworden ist!) Dann kann man in verschiedener Weise verfahren, nämlich

1. Man kann das Röhrchen, so wie es ist, dauernd aufbewahren. Bedingung: Fester Schluss der Gummikappe, sonst trocknet die Kultur allmählich ein.

2. Man lüftet die Gummikappe, schiebt den Wattebausch etwas tiefer in das Röhrchen, giesst eine dicke Schicht flüssig gemachten Paraffines auf ihn und lässt das Paraffin erstarren. Nachfüllen von Paraffin, wenn Sprünge darin auftreten.

3. Man entfernt die Gummikappe, legt auf die Rohrmündung ein diese genau verschliessendes rundes Deckgläschen, bepinselt Rohrmündung und Deckglas dick mit Glyzeringelatine (s. S. 113 A), (statt Karbolsäure kann 1 % Sublimat zugesetzt sein!), lässt antrocknen und überzieht mit Lack.

4. Man erhitzt eine leicht schmelzende Metalllegierung (Rosesches Metall, fusible metal) mit dem Bunsenbrenner und lässt Tropfen davon aus $^1/_4$—$^1/_2$ m Höhe auf eine Glasplatte fallen. Die aus solch einem Tropfen dabei entstehende flache Metallscheibe legt man nach Entfernung der Gummikappe auf die Röhrchenmündung, drückt die überstehenden Ränder fest ans Glas und bringt sie durch langsames Drehen in der Bunsenflamme zum luftdichten Anlegen.

5. Man entfernt Gummikappe und Wattebausch und schmilzt das Röhrchen etwas unterhalb der Mündung zu. Vorsicht, dass der Nährboden beim Erhitzen des Glases nicht leidet!

NB. Röhrchen, die Kondenswasser enthalten, bewahre man stets in senkrechter Stellung auf; oder man giesst oder

saugt mit Glaskapillare vor der Formalinbehandlung das Wasser vorsichtig ab.

Kulturen in Schälchen kann man auf folgende Weise konservieren:

1. Man bringt ein paar Tropfen Formalin auf den Deckel und lässt 24 Stdn. stehen. (Wenn angängig, Schälchen umgekehrt aufstellen, damit das Formalin nicht auf den Nährboden tropft; sonst befestigt man mit Wachs ein Stück Fliesspapier an der Deckelinnenseite und befeuchtet es mit Formalin). Dann entfernt man das Formalin (falls es nicht schon verdunstet ist) und legt ein breites Gummiband um den Rand der Schale.

2. Man kultiviert in Schälchen mit überfassendem, aufgeschliffenen Deckel, behandelt wie bei 1. mit Formalin und dichtet schliesslich den Berührungsring beider Schälchenhälften mit Paraffin.

3. Man kultiviert in flachen Kolben von der Form plattgedrückter Reagenzgläser etc. (käuflich) und behandelt sie wie Röhrchen (vgl. S. 114).

Stücke von Agar- oder Gelatineplatten kann man folgendermassen konservieren:

1. Behandeln mit Formaldehyd ähnlich wie oben angegeben. Vorsichtiges Umschneiden und Loslösen der zu konservierenden Teile, Übertragen auf den Objektträger (ev. Trocknen über H_2SO_4, bis nur eine dünne Schicht übrig ist), Bedecken mit Glyzerin und Deckglas, Umranden mit Asphaltlack. Aussehen der Kolonien leidet. Nur für Agarplatten gut brauchbar.

2. Anlage der Platte auf einem Deckglase, nach Entwickelung Trocknen im Exsikkator über H_2SO_4, Färben wie ein Trockenpräparat, trocknen und in Kanadabalsam konservieren (nicht zur Betrachtung der Kolonien selbst, aber zum Studium der Bakterienlagerung in den Kol. geeignet).

C. Tierorgane für Demonstrationszwecke.

1. Einlegen der Organe bis zur völligen Entfärbung in folg. Lösung: Aq. comm. 4000, Formalin 800, Kal. acet. 85, Kal. nitric. 45.

2. Einlegen nach Ablaufenlassen in 80%igen Alkohol, bis die natürlichen Farben wiedergekehrt sind.

3. Aufbewahren in folg. Lösung dauernd: Aq. dest. 900, Glyzerin 300, Kal. acet. 200.

Register.

A. Stuber's Verlag (Curt Kabitzsch), Würzburg.

Neuigkeiten 1907.

Diagnose und Therapie der Anämien. Nach funktionellen Gesichtspunkten auf Grundlage qualitativer Blutuntersuchungen. Besonders für Ärzte und Studierende. Bearbeitet von Dr. **Josef Arneth**, Privatdozent an der Kgl. Universität Würzburg. Mit 15 lithographischen Tafeln. Preis brosch. M. 9.—

(Für Abonnenten der Würzburger Abhandlungen Vorzugspreis Mk. 7.—)

Die Diagnostik der Magen-, Darm- und Verdauungskrankheiten. Ein Leitfaden für Studierende und Ärzte. Von Dr. **G. Graul.** Mit 1 Tafel und 4 Abbildungen im Text. Preis brosch. Mk. 4.50, geb. Mk. 5.—

Die Syphilis. Laienverständlich erklärt von Spezialarzt Dr. Orlowski. Preis 90 Pfg.

Der Tripper. Laienverständlich erklärt von Spezialarzt Dr. Orlowski. Preis 90 Pfg.

Die vorstehenden beiden Aufklärungsschriften sollen den Arzt in seiner Praxis unterstützen, indem sie dem denkenden Patienten die oft erwünschten näheren Aufschlüsse vermitteln.

Die Schönheitspflege. Für Ärzte und gebildete Laien. Von Spezialarzt Dr. **Orlowski.** Preis Mk. 1.80

Die Impotenz des Mannes. Für Ärzte dargestellt. Von Spezialarzt Dr. **Orlowski.** Preis Mk. 1.80

Die Behandlung der Gonorrhoe des Mannes. Für Ärzte u. Studierende dargestellt von Spezialarzt Dr. **Orlowski.** Preis ca. Mk. 2.50

Populär-Psychiatrie des Sokrates redivivus. Von Dr. **H. Schaefer**, Oberarzt der Irrenanstalt Friedrichsberg bei Hamburg. Preis ca. Mk. 2.50

Ideen und Ideale. Grundriss einer Weltauffassg. von Dr. **Henry Hughes**, Bad Soden. Preis Mk. 1.—